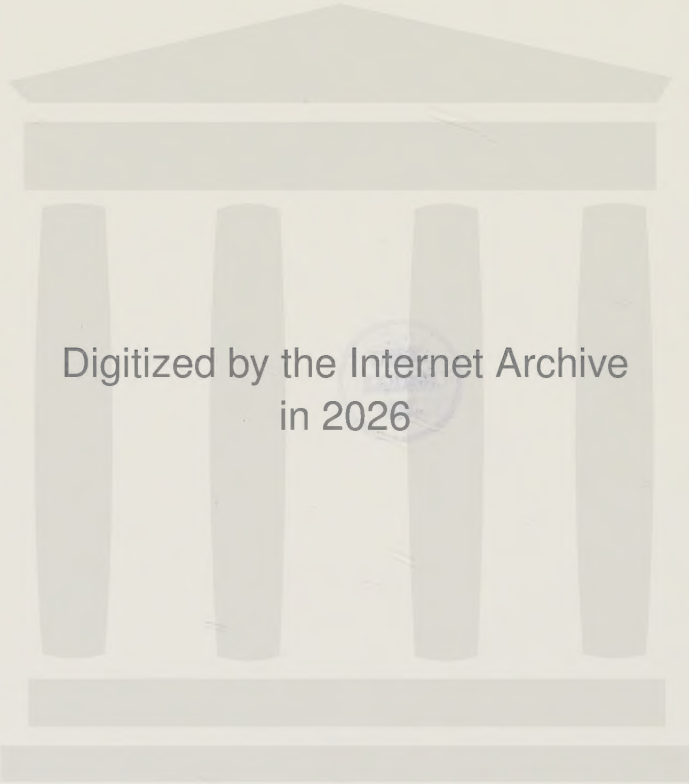


UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKSAMKEIT
DES PARAMUNITÄTSINDUCERS PIND-AVI
ALS LEBERSCHUTZSUBSTANZ

CHRISTIAN PETER ALTSCHUH

*Diss
München
1986*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Untersuchungen über die Wirksamkeit des Para-
munitätsinducers PIND-AVI als Leberschutz-
substanz

Dissertation

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Christian Peter Altschuh

aus

Wasserburg am Inn

November 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. F. R. Ungemach
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. W a g n e r
- Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 1986

Meinen Eltern
Meiner Frau in
Dankbarkeit
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	3
2.1.	Pathophysiologie der Leber	3
2.2.	Leberschädigung und Regeneration	3
2.3.	Wachstumskontrolle bei der regenerierenden Leber	5
	Die Kontrolle durch Wachstumsfaktoren	6
	Die Kontrolle durch Chalone	6
2.4.	Immunologische Aspekte der Leberregeneration	7
2.5.	Eröffnet PIND-AVI neue Wege der Leberschutztherapie ?	8
2.6.	Paramunität und Paramunitätsinducer	9
2.6.1.	Paramunität	9
2.6.2.	Paramunitätsinducer, ihre Möglichkeiten und Grenzen	10
2.6.3.	Der Paramunitätsinducer PIND-AVI	12
2.7.	Untersuchungsstrategie	13
2.7.1.	Der Thymidinstoffwechsel als Charakteristikum des Zellzyklus	13
2.7.2.	Die Stimulierbarkeit Kupfferscher Sternzellen durch PIND-AVI	14
2.7.3.	Beschleunigung der Normalisierung gestörter Leberfunktion	16
3.	Versuche und Ergebnisse	17
3.1.	Hochdruckflüssigchromatographische Trennung von Nukleobasen, Nukleosiden und Nukleosidmono-, -di-, und triphosphaten	17
3.1.1.	Problemstellung	17
3.1.2.	Versuche	20
3.1.3.	Ergebnisse	24
3.2.	Aktivität der Thymidinkinase und Phosphorylierungsmuster von Thymidin in ruhenden sowie regenerierenden Hepatozyten und deren Beeinflussung durch PIND-AVI	27
3.2.1.	Phosphorylierungsmuster von Desoxythymidin in ruhenden und regenerierenden Hepatozyten mit und ohne PIND-AVI-Behandlung	28
3.2.2.	Kinetische Konstanten der hepatozellulären Thymidinkinase	30
3.2.3.	Thymidineinbau in die DNA von ruhenden und regenerierenden Hepatozyten und seine Beeinflussung durch PIND-AVI	33
3.3.	Charakterisierung des Thymidintransports als frühes Merkmal regenerativer Prozesse	36
3.3.1.	Die Konzentrationsabhängigkeit der initialen Thymidinaufnahme	36
3.3.2.	Kinetische Konstanten des Hepatozellulären Thymidintransports	41
3.4.	Entwicklung des Lebergewichts	43
3.5.	Verlaufskontrolle "typischer" Leberenzyme im Serum	47
3.5.1.	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT, E.C. 2.6.1.1)	48
3.5.2.	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Alanin-Aminotransferase (ALAT, E.C. 2.6.1.2)	49
3.5.3.	Alkalische Phosphatase (AP, E.C. 3.1.3.1)	52
3.5.4.	Lactat-Dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27)	53
3.5.5.	γ -Glutamyl-Transferase (GT, E.C. 2.3.2.2)	53
3.5.6.	Totalbilirubin (indirektes und direktes Bilirubin)	54
3.5.7.	Cholesterin	55
3.5.8.	Cholinesterase (CHE, E.C. 3.1.1.8)	56

4.	Stimulierung der immunologischen Aktivität von Kupf-	
	ferschen Sternzellen durch PIND-AVI	59
4.1.	Beschreibung der Kupfferschen Sternzellen	59
4.2.	Hepatische Phagozytose und Immunantwort	60
4.3.	Chemilumineszenzmessung an aktivierten Makrophagen	63
4.4.	Eigene Messungen	67
4.4.1.	Einfluß von PIND-AVI bzw. Silibinin auf in vitro	
	kultivierte Kupfferzellen männlicher Ratten	67
4.4.2.	Einfluß von in-vivo-Vorstimulierung mit PIND-AVI	
	auf die Chemilumineszenz von Kupfferzellen	69
4.4.3.	Einfluß von in-vivo-Vorstimulierung mit Silibinin	
	auf die Chemilumineszenz von Kupfferzellen	69
4.4.4.	Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit der Biolumineszenz nach	
	in-vitro-Aktivierung mit PIND-AVI	70
4.4.5.	Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit der Biolumineszenz nach	
	in-vitro-Aktivierung mit Silibinin	71
4.4.6.	Einfluß verschiedener spezifischer Hemmstoffe für	
	aktive Sauerstoffspezies auf die Biolumineszenz von	
	Kupfferzellen	72
5.	Zusammenfassung	75
6.	Material und Methoden	79
6.1.	Material	79
6.1.1.	Chemische Reagenzien und Biochemika	79
6.1.2.	Physiologische Pufferlösungen und Inkubationsmedien	80
6.1.3.	Laborgeräte	82
6.1.4.	Wirkstoffe	83
6.2.	Methoden	84
6.2.1.	Isolierung von Leberparenchymzellen	84
6.2.2.	Isolierung Kupfferscher Sternzellen	85
6.2.3.	Die 2/3-Hepatektomie	87
6.2.4.	Anfärbbarkeit der Zellen mit Trypanblau	87
6.2.5.	Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs	88
6.2.6.	Peroxidase-Reaktion	88
6.2.7.	Messung der Thymidinaufnahme	88
6.2.8.	Bestimmung des Phosphorylierungsmusters	89
6.2.9.	Bestimmung der ³ H-Thymidin-Inkorporation in	
	die DNA	89
6.2.10.	Messung der Thymidinkinase-Aktivität	90
6.2.11.	Bestimmung der Serumaktivität von typischen Leber-	
	enzymen	90
6.2.12.	Hochdruckflüssigchromatographische Bestimmung der	
	Thymidinmetaboliten	91
6.2.13.	In-vitro-Bestimmung der Biolumineszenz aktivierter	
	Kupfferscher Sternzellen (Chemilumineszenz akti-	
	vierter Makrophagen)	91
7.	Berechnungen	93
7.1.	Enzym- und Transportkinetik	93
7.1.1.	Kinetische Konstanten für Transport- und Enzym-	
	systeme	95
7.2.	Statistische Analyse	95
8.	Literaturverzeichnis	96

Verzeichnis der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen

ALAT	Alanin-Aminotransferase, E.C.2.6.1.2
ASAT	Aspartat-Aminotransferase, E.C.2.6.1.1
AP	Alkalische Phosphatase, E.C.3.1.3.1
ATP	Adenosintriphosphat
CHE	Cholinesterase, E.C.3.1.1.8
CSF	Cell Stimulating Factor
DAB 8	Deutsches Arzneibuch 8. Ausgabe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	(radioaktive) Zerfälle pro Minute
dT	Desoxythymidin
³ H-dT	Tritium-Methyl-markiertes Desoxythymidin
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
dUDP	Desoxyuridindiphosphat
γ-GT; GT	Gamma-Glutamyltransferase, E.C.2.3.2.2
GOT	Glutamat-Oxalacetattransferase, s. ASAT
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase, s. ALAT
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
i.p.	intraperitoneal
KID ₅₀	Kulturinfektiöse Dosis, Erklärung S. 13
K _M	Michaelis-Konstante
K _T	Transport-Konstante, entsprechend der Michaelis-Konstanten
LDH	Lactat-Dehydrogenase, E.C.1.1.1.27
NADPH	Nikotinamiddinukleotidphosphat, reduzierte Form
NADP ⁺	Nikotinamiddinukleotidphosphat, oxidierte Form
PBS	Phosphate Buffered Saline - Lösung
16-α-PCN	16-α-Pregnenoloncarbonitril
P _i	anorganisches Phosphat
PIND-AVI	Paramunitätsinducer, Erklärung S. 12 ff
pK	Dissoziationskonstante
pK _a	Dissoziationskonstante der aciden Gruppe
pK _b	Dissoziationskonstante der basischen Gruppe
Prot.	Protein
rCDP	Ribocytidindiphosphat
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
S.E.M.	Standard Error of the Mean
SOD	Superoxiddismutase, E.C.1.15.1.1
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid
U	Unit; (Enzym-)Einheit
VSV	Virus Stomatitis Vesicularis
V _{max}	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
V _T	Maximale Transportgeschwindigkeit, entsprechend V _{max}

1. Einleitung

Die bisher angewandte Leberschutztherapie ist wenig effektiv. Die vorhandenen Methoden beschränken sich im wesentlichen auf eine erhöhte Zufuhr von Stoffen, die im Leberstoffwechsel unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen. So werden seit langem Aminosäuren- und Vitamingemische als Therapeutika, allerdings ohne nachweisbare Wirksamkeit eingesetzt.

Neue Aspekte zogen mit isolierten Reinsubstanzen aus *Silybum marianum* L.Gaertn. (1) in die Therapie der erkrankten Leber ein. Noch ohne genaue Kenntnis des Wirkungsmechanismus wurde der Silibinin genannte Wirkstoff zu einem weit verbreiteten Leberschutzpräparat. Sonnenbichler und Mitarbeiter diskutieren für Silibinin folgenden Wirkungsmechanismus: Silibinin bindet spezifisch an Kernproteine, insbesondere an die DNA-abhängige-RNA-Polymerase A (2). In Struktur-Wirkungsuntersuchungen stießen Sonnenbichler et al. auf strukturelle Ähnlichkeiten mit einem zellspezifischen Effektor (3). Vogel und Mitarbeiter postulieren für Silibinin membranotropische Eigenschaften, die durch aktive Bindung des Moleküls an Membranbestandteile einen hepatoprotektiven Effekt bei der α -Amanitinvergiftung der Leber entfalten (4).

Resümiert man die bisher unbefriedigenden Erfolge in der Behandlung der kranken Leber und beachtet die immunologische Bedeutung des Organs innerhalb des retikuloendothelialen Systems (RES), so gewinnen Immunmodulatoren, wie z.B. PIND-AVI, zunehmend an Bedeutung als Alternative in der Therapie von Lebererkrankungen. PIND-AVI ist im Sinne der von Wagner (5) gegebenen Definition der biogenen Herkunft eine Droge, handelt es sich doch dabei um ein attenuiertes, gamma-strahlen-inaktiviertes, lyophilisiertes Virus, das auf den Hühnerpockenstamm HP 1 zurückgeht (6).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, im Hinblick auf die Verwendbarkeit von PIND-AVI bei der Leberschutztherapie einen Beitrag zur Klärung folgender Fragen zu leisten:

1. Inwieweit greift PIND-AVI in den Zellzyklus des Hepatozyten ein ? Resultieren aus einem solchen Eingriff regenerative Prozesse ?

2. Kommt es unter PIND-AVI zu einer Stimulation immunkompetenter Zellen (Kupfferscher Sternzellen) in der Leber ? Ist eine solche Stimulation ein von hepatozellulären Vorgängen getrennter Vorgang ?
3. Hat PIND-AVI einen Einfluß auf die Beschleunigung der Normalisierung der Leberfunktionen ?
4. Läßt sich aus den Ergebnissen ein zusammenhängendes neues Konzept der Leberschutztherapie ableiten,
 - a. **protektiv** durch Vermehrung aktiven Lebergewebes durch untoxische Stimulation der Regeneration ?
 - b. **kurativ** durch Unterstützung und Beschleunigung regenerativer Prozesse nach Leberzellschädigung ?
 - c. **additiv** durch Kombination von Effekten der Regeneration und Immunstimulation ("Abräumerffekt" gegenüber nekrotischen Zellen) ?

2. Schrifttum

2.1. Pathophysiologie der Leber

Nachdem die Leber im Stoffwechsel eines Individuums eine zentrale Rolle einnimmt, ist bei Schädigungen des Organs mit fulminanten Veränderungen im Gesamtorganismus zu rechnen. Akute Leberschäden haben in der Regel schwerwiegende Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel. Hypoglykämie ist häufig, denn es kommt zum Zusammenbruch von Glykogenolyse und Gluconeogenese (7). Auch wirken akute Leberschäden auf den Proteinmetabolismus. In der Regel steigen die Aminosäurespiegel im Blut stark an, selbst ohne Proteinaufnahme. Man kann davon ausgehen, daß der Anstieg seine Ursache u.a. in der Freisetzung von Aminosäuren aus nekrotischen Leberarealen hat in Verbindung mit der verminderten Kapazität der Leber, die Aminosäuren aus dem Plasma zu eliminieren (8). Zu den Veränderungen im Proteinmetabolismus gehören auch Entgleisungen einiger leberspezifischer Enzyme, die mit funktionierender Syntheseleistung des Organs korrelieren. Auch die Freisetzung von Enzymen aus untergegangenen Zellen bzw. solchen, deren Membran permeabel für große Moleküle geworden ist, deutet auf Leberschäden hin. Verschiedene krankhafte Veränderungen zeichnen ein typisches Enzymmuster, das im Serum nachgewiesen werden kann.

2.2. Leberschädigung und Regeneration

Die Leber ist ein Organ mit außerordentlich großer Fähigkeit zur Regeneration. Leberzirrhose und das finale Coma hepaticum sind terminale Zeichen einer lange Zeit überforderten und schließlich erschöpften Regenerationskraft der Leber durch ständig neue Parenchymnekrosen, z.B. bei chronisch-aggressiver Hepatitis oder Alkoholabusus. Finckh und Simpson (9) zeigten bei Ratten, daß unter den experimentellen Bedingungen von bis zu 5 Teilhepatektomien in fünf- bis siebenwöchigem Abstand die Leber lichtmikroskopisch normale Läppchenstruktur, Zytoarchitektur und kompartimentierte Gallenkanalikuli bis zur fünften Teilhepatektomie wiederherzustellen in der Lage ist. Bollmann (10) zeigte, daß nur 10 % restliches intaktes Lebergewebe ausreichen, um vollständige Leberregeneration zu bewirken. In praxi ist die Regenerationskraft der Leber bei akuten Leberschäden z.B. nach Intoxikation jedoch

nur bedingt nutzbar, weil die biochemische Kapazität des Restorgans für ein Überleben des Organismus bis zu einer ausreichenden Regeneration nicht genügt.

"Natürliche" Ursachen für Leberschäden sind beispielsweise die Hepatitiden vom Typ A, Typ B oder non-A-non-B-Typus.

Zu den **"akzidentellen"** Ursachen zählen unter anderem alkoholbedingte Schäden und die Exposition gegenüber halogenierten Kohlenwasserstoffen und anderen Xenobiotika (11), die Wirkung radioaktiver Strahlung (12) sowie die Schädigung durch Pflanzenschutzmittel vom Typ des Paraquat (13). Bei diesen Schädigungen des Leberparenchyms stehen intermediär gebildete Radikale, insbesondere auch aktive Sauerstoffspezies, die mit zellulären Strukturen rasch reagieren, als auslösendes, schädigendes Agens am Beginn des Krankheitsgeschehens.

Experimentelle Schädigungen des Leberfunktionsgewebes lassen sich erzielen mit Tetrachlorkohlenstoff, Galactosamin, Ethionin und der 2/3-Hepatektomie. Die Partialhepatektomie bietet gegenüber anderen Modellen den Vorteil, daß es nicht wie bei Giften zu diffusen Schädigungen des Leberparenchyms kommt, sondern die Regeneration von vollkommen intakten, in unversehrtem Gewebeverband liegenden Zellen ausgeht (14).

Für die Auslösung der Leberregeneration werden zwei Regelkreise postuliert, die voneinander unabhängig über die Größe der Säugerleber wachen:

1. Die Regulation des mittleren Volumens der Leberzellen. Diese ist mit dem Körpergewicht korreliert (15).
2. Die Regulation der Zahl der Leberzellen. Diese ist bei jugendlichen und erwachsenen Ratten ungefähr gleich und beträgt ca. $5 \cdot 10^8$ Zellen (16). Wird durch Teilhepatektomie die sog. "kritische Masse" unterschritten, so beginnen sich Zellen, Zellkerne und Nukleoli ab der 6. bis 12. Stunde nach dem Eingriff zu vergrößern und verdoppeln ihr Volumen etwa bis zur 24. Stunde (17). Parallel dazu kommt es 14 bis 16 Stunden nach Teilhepatektomie zu einem steilen Anstieg der

DNA-Synthese. Ihr Gipfel liegt etwa 22 bis 24 Stunden nach der Partialhepatektomie, wobei der DNA-Synthese entsprechende vorbereitende Schritte z.B. im Thymidinstoffwechsel (Aufnahme, Phosphorylierung) vorangehen, die in ihren Einzelheiten noch nicht vollständig geklärt sind. Mit sechs- bis siebenstündiger Verspätung folgt ein erster Gipfel der Mitosewelle. Ein zweiter, weniger stark ausgeprägter liegt bei etwa 48 Stunden nach der 2/3-Hepatektomie. Der erste Mitosegipfel ist in Höhe und zeitlichem Auftreten von zirkadianen Schwankungen unabhängig und unterscheidet sich darin vom zweiten, der deutlichen zirkadianen Schwankungen unterliegt (18).

Grisham (19) stellte fest, daß die Mitosen der Parenchymzellen nicht randomisiert über die ganze Leber verteilt auftreten, sondern periportal, also in der Läppchenperipherie zuerst auftreten, um dann in Richtung der Zentralvene fortzuschreiten und schließlich zu verebben. Grisham stellte weiter fest, daß das Mitosemaximum für Gallengangsepithelien und Zellen des RES (Kupfferzellen) um etwa 24 Stunden gegenüber den Parenchymzellen verschoben ist.

Zusammen mit dem Proliferationsschub kommt es auch zur Bildung mehrkerniger, z.B. tetra- und polyploider Zellen in der Rattenleber. Bei neugeborenen Ratten findet man in der Leber praktisch nur diploide, mononukleäre Zellen, während in höherem Alter der Anteil dieser Hepatozyten auf etwa 30 % zurückgeht und die polyploiden Zellen etwa 70 % aller Leberparenchymzellen ausmachen. Der Proliferationsschub nach 2/3-Hepatektomie verschiebt nach Grisham das Ungleichgewicht weiter zu Gunsten polyploider Zellen. Auch in der menschlichen Leber gelten polyploide Zellen als Residuen von Regenerationsprozessen nach Parenchymschädigung (20).

2.3. Wachstumskontrolle bei der regenerierenden Leber

Zwei Theorien stehen hier einander gegenüber, wobei weder für die eine noch für die andere endgültige Beweise möglich sind.

1. Die Kontrolle durch Wachstumsfaktoren

Diese Theorie wird von vielen Autoren unterstützt, die zugleich ebensoviele Wachstumsfaktoren postulieren. Die ersten Untersuchungen gehen auf Mann zurück, der 1944 fand, daß der Umfang des portalen Blutflusses durch den Leberhilus für ein Leberwachstum verantwortlich ist (21). Weinbren erweiterte diese Theorie 1955 um den Beitrag humoraler Faktoren (22). Mehrere bekannte Hormone, wie Insulin, Glucagon, Glucocorticoide, Jodthyronin, Somatomedin C und verschiedene "epidermal growth factors" werden ebenso für das Regenerationsgeschehen verantwortlich gemacht wie Hypoxanthin und Inosin (23).

2. Die Kontrolle durch Chalone

Diese Theorie geht letztlich gleichfalls von Wachstumsfaktoren aus, die jederzeit im Organ vorhanden sind, aber unter physiologischen Bedingungen von sog. Chalonen in ihrer Wirksamkeit supprimiert sind. Diese Chalone werden von reifen, ausdifferenzierten Zellen im Sinne einer negativen Rückkopplung ausgesandt, um die teilungsfähigen, generativen Stammzellen an der ungehemmten Bildung von Endzellen zu hindern (24). Diese reversible Proliferationshemmung äußert sich in einer Verlangsamung der Geschwindigkeit der Zellzyklusphasen, hauptsächlich der G_0 - und G_1 -Phase. Der Begriff "Chalon" wurde bereits 1913 aus dem Griechischen (chalao = ich bremsen) abgeleitet und für Gegenspieler der Hormone (griechisch hormao = ich rege an) gebraucht. Erst jedoch 1979 gelang es Iversen, die ersten akzeptablen Beweise für deren Existenz zu erbringen (25). Die Chalontheorie scheint zu korrelieren mit der Theorie der kritischen Masse vitaler Zellen, unterhalb der mit der Regeneration begonnen wird und gestützt zu werden durch die Terminierung des Wachstums nach Erreichen einer bestimmten Organgröße (26). Abb. 1 zeigt schematisch die Wirkung von Hormonen und Chalonen auf das Zell- und Gewebewachstum.

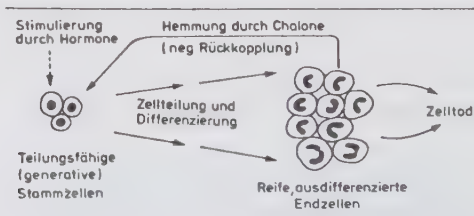


Abb. 1: Regulation des Zell- und Gewebewachstums und der Homöostase (Erhaltung einer bestimmten Zellzahl und Gewebegröße) durch Chalone und Hormone (nach 24)

2.4. Immunologische Aspekte der Leberregeneration

Die Leber ist wesentlicher Teil des retikuloendothelialen Systems. Diese Tatsache läßt im Falle hepatischer Erkrankungen immunologische Auswirkungen erwarten, obwohl deren Mechanismus bis heute kaum verstanden wird (27). Die Leber nimmt für immunologische Reaktionen eine strategisch günstige anatomische Lage ein: zwischen Gastrointestinaltrakt und systemischer Blutzirkulation. In keimfreien Mäusen konnte gezeigt werden, daß aus dem Intestinum resorbierte Mikroorganismen einen bedeutenden Stimulus zur Produktion von Gammaglobulin darstellen, wobei vorwiegend eine Resorption intakter Bakterien oder ihrer Antigene sowohl in das lymphatische als auch in das portal-venöse Gefäßsystem stattfindet (28). Antigene im portal-venösen Blutstrom müssen zuerst die Lebersinusoide passieren, ehe sie in den systemischen Blutkreislauf gelangen. Antigene wie Schaferythrozyten oder *Salmonella adelaide* werden in beträchtlichem Umfang resorbiert (29).

Obwohl die Leber das größte Organ des RES darstellt und in der Lage ist, mehr Antikörper zu bilden als jeder andere Bestandteil, ist seine Immunantwort doch sehr differenziert. Während die Milz Antigene phagozytiert und dadurch zur Produktion von Antikörpern angeregt wird, kann die Leber sie bedeutend schneller und vollständiger phagozytieren, ohne mit Antikörperbildung auf einen solchen Stimulus antworten zu müssen (30). Dies mag mit dem Fehlen von lymphoiden Zellen in größerer Zahl im Gegensatz zu anderen Organen des RES zusammenhängen. Cantor und Dumont folgerten aus dieser Filterfunktion der Leber, daß der Organismus vor übergroßer Sensibilisierung via Gastrointestinaltrakt bewahrt werden solle (31). Diese These wird gestützt durch Versuche, bei denen Tieren mit vorgeschädigter Leber (z.B. mit Tetrachlorkohlenstoff) Antigene zur Phagozytose angeboten wurden. Dabei stieg die Produktion spezifischer und unspezifischer Antikörper signifikant an (32).

Die Makrophagen der Leber oder Kupfferschen Sternzellen zählen zu den sinusoidalen Zellen. Traditionell werden diese in Endothelial- und Kupfferzellen unterschieden. Obwohl morphologisch verschieden, sind ihre Unterschiede oft unklar. Zu keinem Zeitpunkt sind mehr als 30 % der Lebermakrophagen phagozytotisch aktiv.

Über die Kinetik der Makrophagen der Leber ist wenig bekannt, außer daß sie unter normalen Bedingungen seßhaft sind und einen geringen Stoffumsatz haben. Möglicherweise stammen sie von Milz- oder peripheren Blutzellen ab. Innerhalb der Leber sind sie normalerweise nicht teilungsaktiv, doch kann man die Proliferation durch Substanzen wie Zymosan anregen. Als Makrophagen des RES haben sie eine Vielzahl wichtiger immunologischer Aufgaben, insbesondere den Umgang mit Antigenen, das Zusammenwirken mit B- und T-Zellen sowie die Übernahme lebenswichtiger Rollen bei der Regeneration geschädigten Gewebes (27). Deshalb gehörte zur Fragestellung dieser Arbeit zu prüfen, inwieweit PIND-AVI als Immunmodulator neue Möglichkeiten der Leberschutztherapie bzw. der Behandlung der geschädigten Leber eröffnet.

2.5. Eröffnet PIND-AVI neue Wege der Leberschutztherapie ?

Bisherige Ansätze der Leberschutztherapie lagen in der gesteigerten Zufuhr mehr oder weniger essentieller Bausteine des Leberstoffwechsels (Vitamine, Aminosäuren, Glucose) bzw. in der strikten Fernhaltung weiterer Noxen (Alkohol). Silibinin brachte durch Stimulierung der RNA-Synthese (33) einen neuen, mehr rationalen und kausalen Weg für die Therapie hepatischer Erkrankungen. Allerdings erfolgt der Angriffspunkt des Silibinin erst relativ spät im cytotoxischen Geschehen, möglicherweise zu spät für den Betroffenen. Ziel optimaler Leberschutztherapie muß es aber sein, in die Frühphase des cytotoxischen Geschehens einzugreifen, um einen Funktionsausfall zu verhindern bzw. die Regenerationskraft des Organs zu unterstützen und die restitutio ad integrum zu beschleunigen. Solche frühen Induktoren der Leberregeneration dürfen nicht noch zusätzlich hepatotoxisch sein, wie z.B. Phenobarbital.

Eine mögliche Beteiligung des hepatischen Immunsystems an der Leberregeneration könnte einen weiteren Ansatzpunkt für eine neue Form der Therapie liefern, indem frühzeitig nekrotisches Gewebe vermehrt abgeräumt wird, um bessere Ausgangsbedingungen für neue Zellgenerationen zu schaffen. In diesem Zusammenhang scheint es von Interesse, einen bekannten und in der Veterinärmedizin bereits erprobten Immunmodulator, PIND-AVI, im Vergleich mit dem schon traditionell in der Lebertherapie eingeführten Silibinin

und dem starken Leberinduktor 16- α -Pregnenoloncarbonitril (66) auf seine Verwendbarkeit als Leberschutzstoff zu untersuchen.

2.6. Paramunität und Paramunitätsinducer

2.6.1. Paramunität

Paramunität ist nach Mayr (34) der "Zustand eines schnell entstandenen, unterschiedlich lang anhaltenden (Tage-Wochen) Nicht-Erreger- und Nicht-Antigen-spezifischen Schutzes eines Individuums gegenüber einer Mehrzahl ganz unterschiedlicher Infektionserreger, Antigene und Gifte".

Tabelle 1: Grundlagen der Paramunität

FUNKTIONELLE GRUNDLAGEN

1. STEIGERUNG DER INFEKTABWEHR

Erhöhung der Phagozytose
Stimulierung humoraler Faktoren
Stimulierung zellulärer Enzyme

2. AKTIVIERUNG DES LYMPHOPOETISCHEN ZELLSYSTEMS

spezielle Stimulierung der T-Lymphozyten

3. STIMULIERUNG DER SPONTANEN ZELL- VERMITTELTEN ZYTOTOXIZITÄT

Aktivitätserhöhung der normalen Fähigkeit
bestimmter mononukleärer Zellen, geeignete
Zielzellen direkt zu lysieren

4. PRODUKTION BZW. FREISETZUNG VON INTERFERON

ÜBERTRAGBARKEIT

ZELLFREI, PASSIV NICHT ÜBERTRAGBAR

BOOSTER-EFFEKT

NACH ABSINKEN DER ERHÖHTEN KÖRPERFUNKTION
KEINE SPEZIFISCHE GEDÄCHTNISREAKTION

TRAININGSEFFEKT

ANTIGEN-UNSPECIFISCH

Paramunität kann natürlich oder künstlich erworben werden, systemisch ebenso wie lokal. Der lokal - via Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes, der Respirationsorgane oder des Urogenitalbereiches - erworbenen Paramunität kommt besondere Bedeutung zu. Sowohl nach lokaler als auch nach parenteraler Stimulierung wird dem paramunisierten Organismus Gelegenheit zur Reaktion gegeben. Der größte Teil eines lokal aufgebracht Stimulans wird parazellulär persorbiert und in der Lamina propria, einem großen immunologisch wichtigen Organ verarbeitet. Ein kleinerer Teil erreicht über die Blutbahn die zentralen Abwehrorgane. Bei der parenteralen Applikation stehen naturgemäß die zentralen Abwehrorgane bei der Ausbildung der Paramunität im Vordergrund.

2.6.2. Paramunitätsinducer, ihre Möglichkeiten und Grenzen

Bereits in der Vergangenheit wurden Erfahrungen gemacht mit Präparaten zur künstlichen Steigerung der Infektabwehr. Sogenannte Interferoninducer, Immunstimulantien, Lymphozytenmitogene und paraspezifisch wirksame Impfstoffe aktivieren jeweils wenigstens einen der Infektabwehrmechanismen:

- Interferonbildung
- Properdin-Komplement-System
- Phagozytose
- Lymphozytentätigkeit

Dabei gemachte Erfahrungen sowie das Wissen um Ursache-Wirkungsrelationen bei natürlicher (Schutzimpfung, stille Feiung), durch Reiztherapie oder Interferonisierung induzierter Paramunität führten dazu, daß sich heute mehr und mehr Laboratorien damit auseinandersetzen. In Anlehnung an den Ausdruck "Interferoninducer" bezeichnet man Medikamente, die zum Zwecke der Paramunisierung verabreicht werden als "Paramunitätsinducer" (35). Präparate unterschiedlicher Herkunft sind zur Paramunisierung befähigt. Tabelle 2 teilt sie nach ihrer Herkunft in verschiedene Gruppen ein.

Man darf die Wirksamkeit der Paramunitätsinducer jedoch nicht überschätzen. Grundsätzlich können sie nicht mehr bewirken als das Zielorgan herzugeben in der Lage ist. Eine Stimulation bei totaler Immunsuppression (z.B. nach Ganzkörperbestrahlung) ist unmöglich. Die Stärke der Stimulierung einzelner Aktivitäten kann

2.6.3. Der Paramunitätsinducer PIND-AVI

Mayr entwickelte auf Grund seiner Erfahrungen mit der paramunisierenden Wirkung der Pockenschutzimpfung einen Paramunitätsinducer auf der Basis des für Säuger heterologen attenuierten Avipox-Virus (PIND-AVI).

Tabelle 3 charakterisiert das Virus (40).

Eigenschaften von PIND-AVI.		
Klassifizierung	Familie	Poxviridae
	Genus	Avipox-Virus (AP)
	Spezies	Avipox-Virus gallinae
	Stamm	HP-1
	Virus	M-HP-338
natürliche Wirte	0	
Versuchstiere	Eintagsküken Huhn	
Vermehrungssysteme	1. Chorioallantoismembran (CAM) 10tägiger Hühnerembryonen optimaler Titer: $10^{6.5}$ EI-ID ₅₀ /ml 2. Hühnerembryofibroblasten-Kulturen optimaler Titer: $10^{6.5}$ KID ₅₀ /ml	
Wirksamkeit	vermehrungsfähig und strahleninaktiviert	
Onkogenität	0	
Teratogenität	0	
Pyrogenität	0	
Gefahr für belebte Umwelt	0	
funktionelle Grundlagen	Steigerung der Erreger-unspezifischen Infektabwehr, Induktion von Interferon, Stimulierung von Lymphozyten, breite antiinfektiöse Wirksamkeit, Strahlenschutzsubstanz	

Mayr beschreibt in (40) die Herstellung und Standardisierung des Inducers. Das paramunisierende Virus geht auf den Hühnerpockenstamm HP-1 zurück, der über zahlreiche Passagen in Hühner-Fibroblastenkulturen bis zum Verlust der Virulenz attenuiert und nach der 438. Passage Plaque-gereinigt wurde. Die Virusernte der dritten Plaque-Passage wurde in Hühner-Fibroblasten-Zellkulturen aus leukosefreien Valo-Eiern vermehrt und lyophilisiert. Diese stellt

das Saatvirus für den Inducer dar. Für die Herstellung des PIND wird es in steriler Rinderamnionflüssigkeit vermehrt. Die Virus-ernten werden mittels Ultraschall aufgeschlossen, durch fraktionierte Zentrifugation gereinigt und in der Regel nach Zugabe von 2,5 % Gelatine lyophilisiert. Die Endpräparate haben einen Titer von $10^{7,75}$ bis $10^{8,5}$ KID₅₀/ml^{*)}. Zur Anwendung wird das lyophilisierte Virus in 1 ml sterilem Aqua ad injectabilia aufgenommen. Am Virus werden zur Standardisierung weitere Untersuchungen vorgenommen, ehe es an forschende Institute abgegeben wird, so z.B. Unschädlichkeitsuntersuchungen an Mäusen, Welpen, trächtigen Hündinnen, Kaninchen und Ferkeln, Interferonnachweis im Humanserum, Phagozytostest an NMRI-Mäusen, Pyrogentest nach DAB 8 und Infektionsbelastungsversuche mit Testkeimen (Influenzavirus A 2/Japan, Columbia-SK-Virus, Stomatitis-Vesicularis-Virus, Maul- und Klauenseuche-Virus, *Listeria monocytogenes* und *Pasteurella multocida*).

2.7. Untersuchungsstrategie

2.7.1. Der Thymidinstoffwechsel als Charakteristikum des Zellzyklus

Die Untersuchung regenerativer Prozesse erfolgt anhand zellzyklusabhängiger Veränderungen des Thymidinstoffwechsels des Hepatozyten, beginnend beim Membrantransport über die Aktivität der Thymidinkinase, die weitere Phosphorylierung bis zum Einbau in die DNA. Dabei handelt es sich um die Beobachtung der relevanten Einzelschritte beim Übergang des ruhenden Hepatozyten aus der G₀-Phase in die S-Phase des regenerierenden Hepatozyten (Abb. 2). Anhand der Kenntnis der diesbezüglich bestehenden Unterschiede zwischen ruhenden und regenerierenden Hepatozyten können die Einflüsse von PIND-AVI auf den Thymidinstoffwechsel und eine mögliche Stimulation der Zellen zu aktivem Wachstum beurteilt werden.

^{*)} KID₅₀ = Kultur-Infektiöse-Dosis; Virusdosis, bei der mindestens 50 % aller beimpften Zellkulturen virusspezifisch verändert werden.

Die Transportvorgänge erlauben zudem einen Rückschluß auf die Zellvitalität hinsichtlich intakter Membranfunktion (11). Durch die Untersuchungen isolierter Hepatozyten können leberexterne (z.B. humorale) Faktoren und Vorgänge innerhalb anderer Zellpopulationen der Leber (RES) ausgeschlossen werden, welche die tatsächlichen Ereignisse auf hepatozellulärer Ebene überdecken können.

2.7.2. Die Stimulierbarkeit Kupfferscher Sternzellen durch PIND-AVI

Untersuchungen über die Stimulierbarkeit der phagozytotischen Eigenschaften von Kupfferschen Sternzellen geben Aufschluß über die immunologische Lage innerhalb der Leber. Um auch hier Wechselwirkungen mit anderen Leberzellpopulationen einerseits und anderen immunkompetenten Faktoren des Organismus (zelluläre und humorale Faktoren des Immunsystems) andererseits auszuschließen, wurden die Untersuchungen an isolierten Kupfferzellen durchgeführt. Als Parameter der Aktivierung der immunologischen Eigenschaften dient die Bildung aktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Zellmembran stimulierter immunkompetenter Zellen.

Sowohl die Experimente zur Untersuchung des Thymidinstoffwechsels als auch die immunologischen Arbeiten wurden an isolierten Zellen in Kurzzeitkulturen in Suspension durchgeführt. Durch Optimierung der Präparationsmethoden (41) haben die Zellkulturen einen so hohen Qualitätsstandard erreicht, daß sie als System angesehen werden können, das den Verhältnissen der Gesamtleber in vivo gleicht (42) und für das umfangreiche Kenntnisse über grundlegende Stoffwechselprozesse vorliegen (11). Neben der bereits erwähnten Ausschaltung leberexterner, wie z.B. neurogener, hormoneller und hämodynamischer Faktoren erlauben isolierte Zellen in chemisch exakt definierbarer Umgebung problemlosen Wechsel des Inkubationsmediums, vereinfachte Probennahme, vergleichende Untersuchungen innerhalb einer Zellpopulation und die Einsparung von Tierversuchen (11).

STIMULI DER LEBERREGENERATION

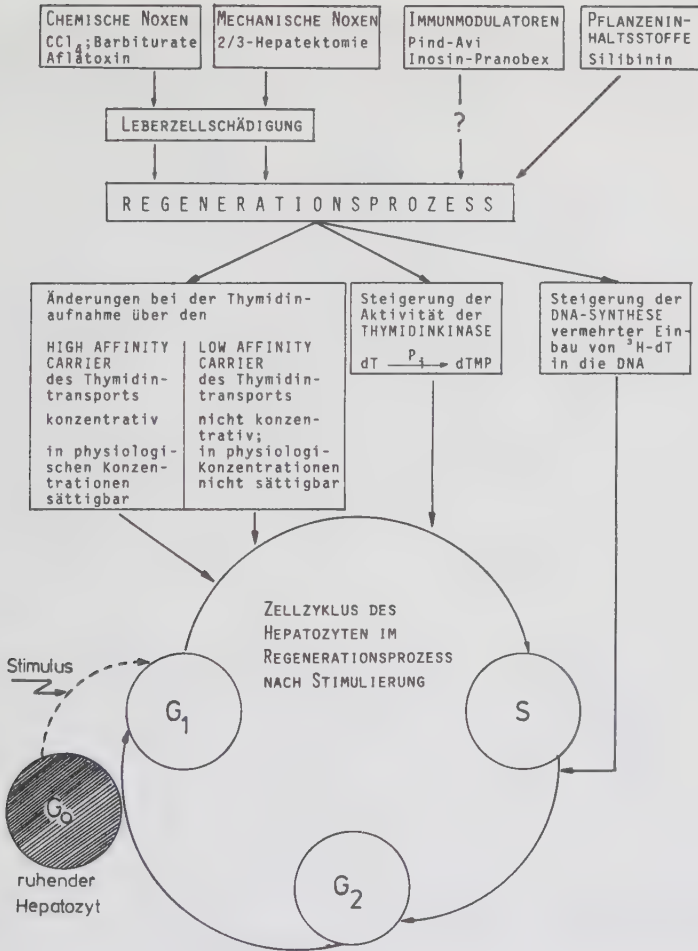


Abb. 2: Schematische Darstellung der möglichen Auswirkungen von Regenerationsstimuli auf den Thymidinstoffwechsel ruhender Hepatozyten durch Übergang der Zellen aus der G₀-Phase in die G₁-, S- und G₂-phase

2.7.3. Beschleunigung der Normalisierung gestörter Leberfunktion durch PIND-AVI

Gestörte Leberfunktionen äußern sich in typischen Veränderungen der leberspezifischen Serumenzyme. Normalisierungen im Enzymmuster korrelieren mit einer Erholung der gestörten Funktion und damit mit dem regenerativen Geschehen.

3. Versuche und Ergebnisse

3.1. Hochdruckflüssigchromatographische Trennung von Nukleobasen, Nukleosiden und Nukleosidmono-, -di- und -triphosphaten.

3.1.1. Problemstellung

Ehe der Hepatozyt mit der DNA-Synthese beginnt, laufen einschneidende Veränderungen im Metabolismus der DNA-Präkursoren ab (Abb. 3). Während in der ruhenden Leber die Spiegel der Desoxyribonukleosidtriphosphate sehr gering sind (unter 1 - 5 nmol/g Feuchtgewicht), steigen sie in der regenerierenden stark an (43). Dabei werden maximale Triphosphatspiegel 24 bis 27 Stunden nach Auslösung der Regeneration gefunden (44), parallel zum Anstieg der DNA-Syntheserate. Beim Eintritt des Hepatozyten in die S-Phase beginnt der intrazelluläre Triphosphatpool auf das vier- bis zehnfache des Normalwertes zu steigen.

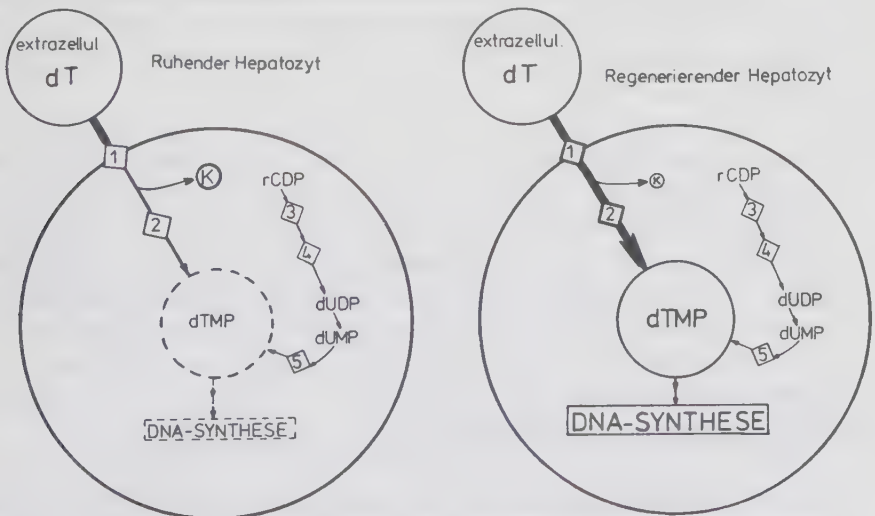


Abb. 3: Veränderungen im Metabolismus des Thymidins beim Übergang vom ruhenden in den regenerierenden Hepatozyten. Extrazelluläres Thymidin wird vermehrt eingeschleust, phosphoryliert und zur DNA-Synthese verwendet. Katabolische Reaktionen nehmen ab.

1 = Thymidintransportsystem; 2 = Thymidinkinase; 3 = Ribonukleotidreduktase; 4 = Desaminase; 5 = Thymidilatsynthetase; K = Kataboliten

Der Bildung energiereicher Triphosphate gehen weitere Schritte voraus: angefangen von der Einschleusung bzw. de-novo-Synthese der Nukleoside bis zum Aufbau der Mono- und Diphosphat-Zwischenstufen.

Diese einschneidenden Veränderungen im Nukleosidstoffwechsel lassen sich besonders am Beispiel des Thymidins studieren. Desoxythymidin eignet sich besonders für Untersuchungen am Nukleosidmetabolismus, weil es

1. vom ruhenden Hepatozyten praktisch nicht für die Nukleinsäuresynthese verwendet wird und
2. von proliferierenden Zellen ausschließlich in die DNA eingebaut wird.

Abb. 3 vergleicht schematisch den Stoffwechsel des Thymidins am ruhenden und regenerierenden Hepatozyten. Extrazelluläres Thymidin wird vom ruhenden Hepatozyten zwar in geringen Mengen über die Membran aufgenommen, jedoch in erheblichem Maß zu nicht weiter verwertbaren Kataboliten abgebaut (45). Der bestehende, kleine Thymidinmonophosphatpool wird hauptsächlich aus der Quelle Ribocytidindiphosphat via Desoxyuridinmonophosphat gespeist. Ein Aufbau von höher phosphorylierten Thymidinnukleotiden findet nur in geringem Umfang statt, der Einbau in die DNA ist praktisch vernachlässigbar.

Regenerierende Hepatozyten nehmen erhebliche Mengen Thymidin über die Zellmembran auf. Als Folge der Erhöhung des intrazellulären Thymidinmonophosphatpools und einer umfangreichen Weiterphosphorylierung zum Di- und Triphosphat entsteht ein ausreichendes Angebot an Vorstufen für den stark gesteigerten Thymidineinbau in die DNA. Diese Reaktionskette bewirkt einen beständigen Konzentrationsgradienten ("Sog"), welcher die Aufnahme extrazellulär angebotenen Thymidins weiter fördert und katabolische Abbaureaktionen weitgehend zurückdrängt (46).

Als maximal proliferationsaktive Zellen hepatischer Herkunft zeigen Aszites-Hepatoma-Zellen qualitativ gleiche, quantitativ noch stärker ausgeprägte Veränderungen im Thymidinstoffwechsel (47). Typischerweise ist bei der Blockade der Thymidinphosphorylierung durch ATP-Verarmung auch in diesen Zellen der Thymidinkatabolismus deutlich gesteigert (48).

Voraussetzung für die Untersuchungen zum Thymidinmetabolismus ist eine ausreichende Auftrennung der hierbei auftretenden Nuklein-

säurebausteine wie Nukleobasen, Nukleoside und Nukleotide. Diese physiologischen Bestandteile unterscheiden sich innerhalb der einzelnen Substanzklassen oft nur sehr gering in ihren chemischen und physikochemischen Eigenschaften. Deutliche Unterschiede bestehen dagegen zwischen den Nukleosiden und ihren phosphorylierten Derivaten hinsichtlich Löslichkeit, Polarität, Acidität bzw. Basizität und Molekulargewicht.

Tabelle 4 und 5 stellen die p_K -Werte verschiedener Verbindungen aus den einzelnen Substanzklassen dar (49).

Tabelle 4

p_K -Werte einiger Pyrimidin- und Purinbasen sowie von Nukleosiden

pyr-N = Pyrimidinring-Stickstoff; imi-N = Imidazolring-Stickstoff

Substanz	p_{Kb}	pyr-N	p_{Kb}	imi-N	p_{Kb}	-NH ₂	p_{Kb}	-OH
Uracil	0,5		-		-		9,45 und	13
Thymin	0						9,82 und	13
Adenin	0,5		9,8		4,22	-		
Guanin	-		12,2		3,3	-		
Cytidin	-		-		4,22	-		
Uridin	-		-		-		9,17	
Thymidin	-		-		-		9,8	
Adenosin	?		-		3,45	-		
Guanosin	-		-		1,6		9,16	
Cytosin	?		-		4,6	-		

Tabelle 5

Dissoziationskonstanten von Nukleosidestern der Phosphorsäure

Substanz	p_{Ka} 1	p_{Ka} 2
Phosphorsäure	1,97	6,82
Adenosinmonophosphat	0,9	6,1
Cytidinmonophosphat	0,8	6,3
Guanosinmonophosphat	0,7	6,1
Uridinmonophosphat	1,0	6,4
Adenosintriphosphat	-	6,5
Thymidintriphosphat	1,6	6,5

Wegen der breiten Palette möglicher Verbindungen in biologischer Matrix und der gravierenden Unterschiede im chromatographischen Verhalten, insbesondere zwischen phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Verbindungen wurden bisher fast ausschließlich Trennverfahren für die Substanzen innerhalb ihrer einzelnen Gruppen beschrieben. Zur Trennung komplexer Gemische aus Nukleobasen, Nukleosiden und ihren Mono-, Di- und Triphosphaten bestehen bis heute nur wenige arbeitsintensive Methoden. Randerath (50) beschreibt eine zweidimensionale dünnschichtchromatographische Trennung an Cellulose-Anionenaustauschern unter Verwendung von bis zu sechs Fließmitteln mit Methanolzwischenbehandlung. Von Hägele et al. (51) wurde ein Trennverfahren mittels HPLC auf reversed-phase Säulenmaterial entwickelt, das zur sukzessiven Auftrennung der Substanzen innerhalb ihrer Gruppen und zur Auftrennung dieser Gruppen voneinander einer aufwendigen Säulenschalttechnik bedarf. Floridi (52) entwickelte eine Einschrittmethode für die HPLC auf der Basis starker Anionenaustauscher, doch ist die dafür erforderliche Elutionszeit von 225 Minuten für häufige Serienanalysen wenig praktikabel.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb ein Verfahren zur chromatographischen Trennung von Nukleobasen, Nukleosiden und Nukleotiden in ihren verschiedenen Phosphorylierungsstufen entwickelt werden, das bei vertretbarem Zeitaufwand die Auftrennung in einem Arbeitsschritt mit ausreichender Basislinientrennung ermöglicht und auch bei Einsatz radioaktiver Substanzen Basislinienstabilität ohne Memoryeffekte gewährleistet.

3.1.2. Versuche

Ein in früheren Untersuchungen angewendetes, nach Randerath modifiziertes, zweidimensionales dünnschichtchromatographisches Verfahren zur Trennung und Quantifizierung radioaktiv markierten Thymidins und davon abgeleiteten Stoffwechselprodukten war trotz ausreichend guter Trennschärfe (Abb. 4) in seiner Anwendbarkeit begrenzt:

1. Eine gute Trennleistung konnte mit diesem arbeitsintensiven Verfahren nur für Abkömmlinge einzelner Nukleobasen erreicht werden. Komplexe Gemische von Derivaten unterschiedlicher

Nukleobasen konnten nicht ausreichend getrennt werden.

2. Eine Quantifizierung, insbesondere von ^3H -markierten Substanzen war erst nach Auskratzen und nachfolgender Elution möglich - mit einer dadurch begrenzten Reproduzierbarkeit.

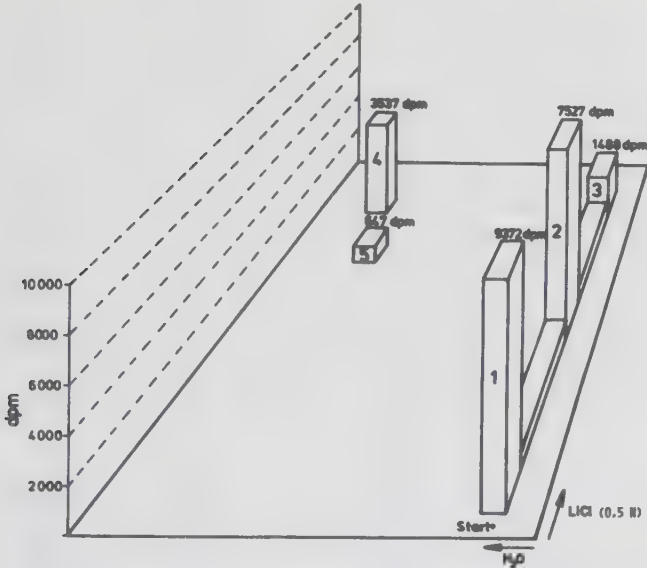


Abb. 4: Dreidimensionale Darstellung eines Dünnschicht-Radiochromatogrammes auf PEI-Zellulose-Platten. Detektion durch Fluoreszenzlösung bei 254 nm. Quantifizierung nach Auskratzen und Elution mittels stationärem Flüssigszintillationsverfahren.
1 = Thymidintriphosphat; 2 = Thymidindiphosphat; 3 = Thymidinmonophosphat; 4 = Thymidin; 5 = Thymin

Zum Ersatz der DC-Analyse und vor allem im Hinblick auf eine mögliche on-line-Detektion wurden Versuche mit einer von Fitt et al. beschriebenen Methode (53) zur Auftrennung mittels Niederdrucksäulenchromatographie unternommen. Als Trennmateriale diente der stark basische Anionenaustauscher Aminex AG 1 X 2 in der Chloridform, als Eluent entweder Natriumacetat- oder salzsaure Lithiumchloridlösung. Mit diesem Verfahren konnte jedoch keine ausreichende Trennung der verschiedenen Phosphorylierungsstufen erzielt werden. Vermutlich lag die Ursache in der starken Bindung des Chloridanions an die Polystyrolmatrix, denn bei Verwendung des - entsprechend der eluotropen Reihe - schwächer bindenden Formiatanions als Gegenion wurde sofort eine gute Trennung erreicht. Unter optimalen Bedingungen konnte mittels eines progressiv steigenden Gradienten von 0 bis 0,75 N Formiatpuffer (pH 3,5) und isokratischem Wasservorlauf zur Abtrennung nicht phosphorylierter Anteile eine gute Trennung von Adenosin und Thymin mit ihren jeweiligen phosphorylierten Derivaten innerhalb von 4 Stunden durchgeführt werden (Tab. 6). Dieses Verfahren wies somit die gewünschte Trennschärfe - bei allerdings langer Analysenzeit - auf.

Tabelle 6

Vergleichende Gegenüberstellung der absoluten Retentionszeiten verschiedener Nukleoside und Nukleotide bei unterschiedlichen Trennverfahren

Niederdruckflüssig- chromatographie mit DOWEX AG 1 X 2 250 x 16 mm	Hochdruckflüssig- chromatographie mit AMINEX A 27 250 x 4 mm	Substanz
42,0 min	3,2 min	Thymin
72,5 min	5,3 min	Adenosin
108,0 min	34,0 min	Adenosinmonophosphat
137,5 min	48,5 min	Thyminmonophosphat
148,0 min	68,5 min	Adenosindiphosphat
182,0 min	72,0 min	Thyminindiphosphat
224,0 min	92,5 min	Thymintriphosphat
224,0 min	89,0 min	Adosintriphosphat

Eine Möglichkeit zur Reduzierung der Analysenzeit lag in der Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf die Hochdruckflüssigchromatographie. Als Säulenmaterial in der HPLC diente Aminex A 27, ein Analogon des AG 1 X 2 Harzes, jedoch mit höherem Vernetzungsgrad (8 % gegenüber 2 % Quervernetzung) und geringerer Korngröße (13 μm). Unter fast gleichen Elutionsbedingungen trennte sich ein Testgemisch aus 14 Nukleinsäurebausteinen in 100 Minuten vollständig (Tab. 6 und Abb. 5). Gleichzeitig sank die untere Nachweisgrenze bei spektroskopischer Detektion um den Faktor 50.

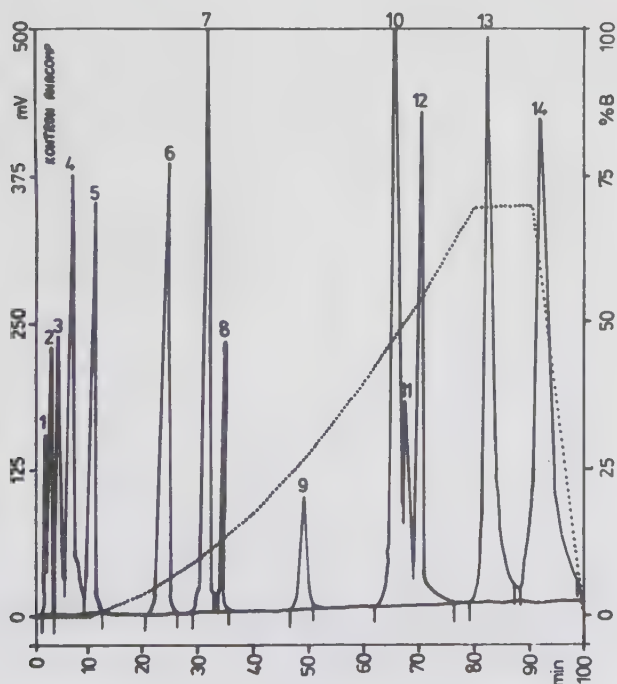


Abb. 5: HPLC-Trennung von 14 Reinsubstanzen. Trennsäule Aminex A 27, 250 x 4 mm; 10 μm . Elutionsmittel A = Wasser, B = Ammoniumformiatpuffer 1,0 N, pH 3,5. Fluß = 1 ml/min.
 1 = Cytidin; 2 = Thymidin; 3 = Adenin; 4 = Guanosin; 5 = Thymin; 6 = Inosin; 7 = Inosinmonophosphat; 8 = Adenosinmonophosphat; 9 = Thyminmonophosphat; 10 = Cytidinmonophosphat; 11 = Adenosindiphosphat; 12 = Thyminindiphosphat; 13 = Inosintriphosphat; 14 = Thyminintriphosphat. Detektion: UV 267 nm

3.1.3. Ergebnisse

Das in Abb. 6 dargestellte Radiochromatogramm eines zellfreien Extraktes aus Zajdela-Ascites-Hepatomzellen nach Inkubation mit Methyl- ^3H -Thymidin zeigt eine deutlich abgesetzte Trennung von Thymin, Thymidin und seinem Mono-, Di- und Triphosphat. Zwischen den Peaks wurde der Untergrund wieder erreicht. Die Wiederfindungsrate der eingesetzten Radioaktivität betrug 98 bis 105 % ($\bar{5} \pm \text{S.D.}$ aus 5 Versuchen).

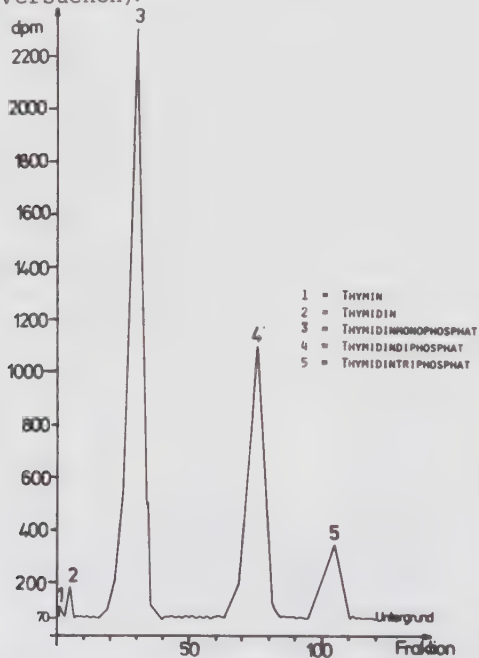


Abb. 6: HPLC-Radiochromatogramm der säurelöslichen Hepatomzellfraktion. Detektion: Fraktionen zu 2 ml werden gesammelt, mit 3 ml Szintillator versetzt und statisch gemessen. Elutionsbedingungen siehe Legende zu Abb. 5. ^3H -Thymidin-Konzentration 5 $\mu\text{mol/l}$, Inkubationsdauer 60 min.

Für ^3H -Thymidintriphosphat mit einer spezifischen Aktivität von $2,5 \cdot 10^8 \text{ Bq/mmol}$ wurde bei stationärem Meßverfahren im Flüssigszintillationszähler als untere Nachweisgrenze 150 fmol bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 2:1 ermittelt. Für ^3H -Thymidin, das durch seine Retentionszeit eine geringere Peakverbreiterung aufweist, liegt die untere Nachweisgrenze unter den genannten Bedingungen bei 90 fmol. Das Trennsystem erwies sich in einer Verdünnungsreihe im Bereich von 90 fmol bis 540 nmol als linear. Die

Standardabweichung bei 5 Einzelmessungen lag für jeden Meßpunkt unter 10 % ($\bar{x} \pm S.D.$) bei stationärem Szintillationszählverfahren über 5 Minuten. Selbst nach über 100 Läufen wurde kein Anstieg des Untergrundes festgestellt. Die Validität dieses Analysenverfahrens erwies sich bei Untersuchungen zum Thymidin- und Uridinstoffwechsel von Hepatozyten ebenso wie von Thymozyten (54, 55).

Abb. 7 zeigt ein typisches Chromatogramm der Auftrennung der Thymidinmetaboliten aus Thymozyten, Abb. 8 ein solches aus ruhenden Hepatozyten und Abb. 9 eines aus regenerierenden Hepatozyten. Das unterschiedliche chromatographische Bild ergibt sich aus dem grundsätzlich differenten Thymidinmetabolismus in stark proliferativen Thymozyten bzw. ruhenden Hepatozyten, die in der G_0 -Phase arretiert sind und regenerierenden Hepatozyten, die in die S-Phase des Zellzyklus übergegangen sind.

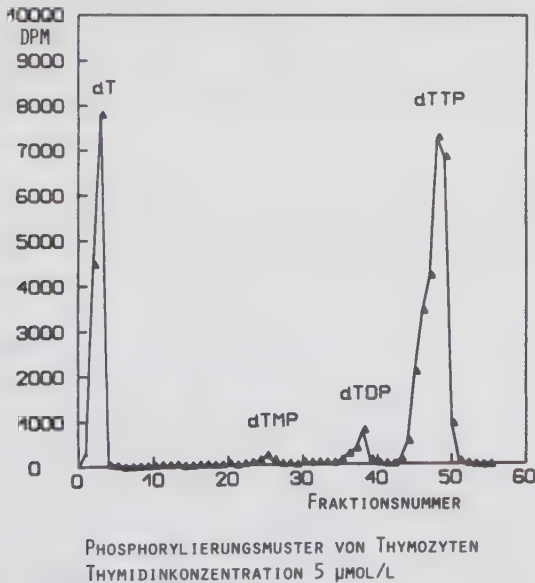
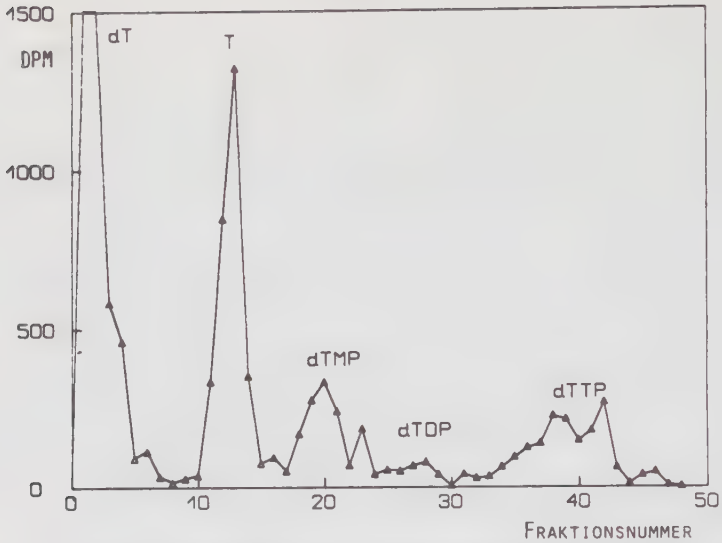
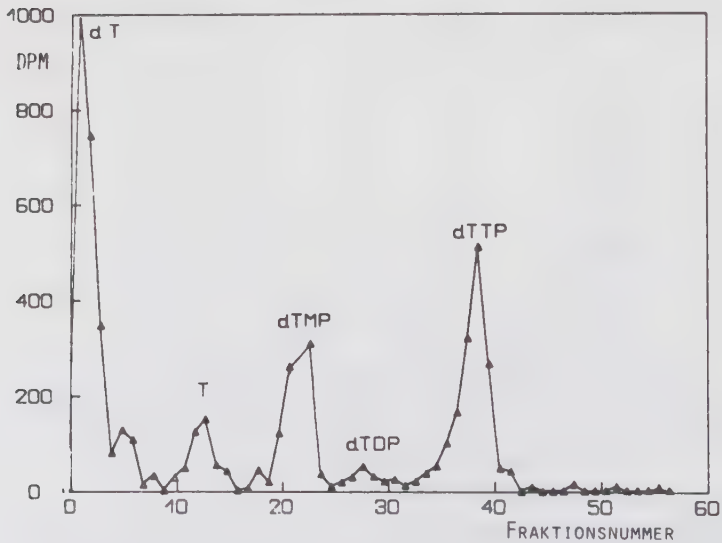


Abb. 7: HPLC-Radiochromatogramm der säurelöslichen Thymozytenfraktion. Elutionsbedingungen siehe Legende zu Abb. 5. Detektionsbedingungen siehe Legende zu Abb. 6.



PHOSPHORYLIERUNGSMUSTER RUHENDER HEPATOZYTEN KONTROLLE
THYMIDINKONZENTRATION 5 μ MOL/L



PHOSPHORYLIERUNGSMUSTER REGENERIERENDER HEPATOZYTEN
THYMIDINKONZENTRATION 5 μ MOL/L

Abb. 8 und 9: HPLC-Radiochromatogramme der säurelöslichen Fraktionen aus ruhenden und regenerierenden Hepatozyten nach Teilhepatektomie. Elutionsbedingungen siehe Legende zu Abb. 5. Detektionsbedingungen siehe Legende zu Abb. 6.

Zusammenfassend zeichnet sich die neuentwickelte Methode gegenüber der bisher gebräuchlichen durch folgende Vorteile aus:

1. Die Analysenzeit ist verglichen mit anderen Verfahren kurz. Die Methode benötigt keinen weiteren Aufwand, wie z.B. Säulenschaltungen.
2. Die analytische Säule wird durch die chromatographischen Bedingungen nur gering belastet. Über mehr als 1000 Analysen ist bisher noch kein Nachlassen der Trenneigenschaften festzustellen.
3. Das Elutionsmittel kann bei Bedarf - ähnlich organischen Lösungsmitteln - unter milden Bedingungen, z.B. Gefrier-trocknung, rückstandsfrei aus gesammelten Fraktionen abgezogen werden, da alle Bestandteile flüchtig sind.
4. Das Elutionsmittel ist sowohl mit Feststoff- als auch Flüssigszintillatoren verträglich, so daß eine direkte on-line-Detektion der Radioaktivität möglich ist.
5. Das Elutionsmittel ist im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln besser umweltverträglich und bedarf keiner aufwendigen Entsorgung.

3.2. Aktivität der Thymidinkinase und Phosphorylierungsmuster von Thymidin in ruhenden sowie regenerierenden Hepatozyten und deren Beeinflussung durch PIND-AVI

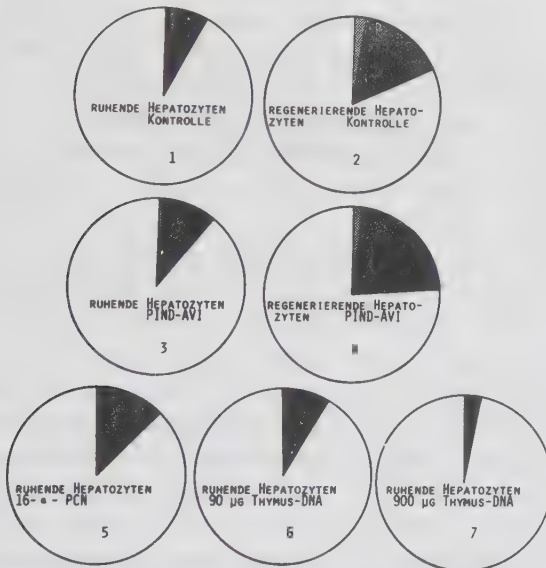
Nicht regenerierende Hepatozyten befinden sich fast ausschließlich in der G₀-Phase des Zellzyklus. Nach Ungemach und Hegner besitzen sie eine sehr geringe Aktivität der Thymidinkinase (56). Nach Aufnahme in das Zellinnere wird Thymidin in ruhenden Hepatozyten nur in geringen Mengen phosphoryliert und für den Einbau in die DNA bereitgestellt. Unbehandelte ruhende Hepatozyten phosphorylieren bei einer angebotenen Thymidinkonzentration von 5 µmol/l nur rund 7,5 % des aufgenommenen Thymidins und bauen nur 0,25 % der Gesamtfraktion in die DNA ein. Unter dem Einfluß von Agentien, welche die Hepatozyten zum Eintritt in den Zellzyklus stimulieren, steigt die Aktivität der Thymidinkinase, gefolgt von einer Zunahme der Einbaurate in die DNA (57).

3.2.1. Phosphorylierungsmuster von Desoxythymidin in ruhenden und regenerierenden Hepatozyten mit und ohne PIND-AVI-Behandlung

Mit dem entwickelten HPLC-Nachweisverfahren war es möglich, Veränderungen der Verhältnisse von phosphorylierten zu nicht phosphorylierten Anteilen des Thymidins in Hepatozyten unter dem Einfluß verschiedener Substanzen qualitativ und quantitativ zu erfassen (Abb. 10). Unter PIND-AVI-Behandlung steigt bei nicht regenerierenden Hepatozyten (Abb. 10/1 und 10/2) der Anteil phosphorylierten Thymidins einschließlich der in die DNA eingebauten Nukleotide um 31 % gegenüber unbehandelten Kontrollen an. Eine stärkere Induktion der Thymidinphosphorylierung geht nur noch von 16- α -PCN (Abb. 10/5) aus, unter dessen Einfluß sich die Phosphorylierungsaktivität um 59 % erhöht. Da es sich bei Avipox-Viren um DNA-Viren handelt, war es von Interesse, ob evtl. die DNA-Fraktion des Lyophilisats für die Wirkung verantwortlich gemacht werden könnte, insbesondere da exogene DNA als Stimulus für proliferative Prozesse in RES-Zellen bekannt ist (58). Nach Säurehydrolyse wurde UV-spektroskopisch die Menge DNA je Dosis PIND-AVI bestimmt. Dann wurden Ratten unter den gleichen Bedingungen mit Thymus-DNA der inducer-äquivalenten Dosis (90 μ g) und der zehnfach überhöhten Dosis (900 μ g) behandelt. Das Ergebnis ist in Abb. 10/6 und 10/7 dargestellt. Eine dem DNA-Gehalt von PIND-AVI äquivalente Menge Thymus-DNA konnte keine signifikante Steigerung der Phosphorylierungsrate auslösen (im Mittel 7 % gegenüber Kontrolle), die zehnfach überhöhte Dosis hemmte sowohl Phosphorylierung als auch Einbau in die hepatozelluläre DNA um durchschnittlich 63 % signifikant ($p < 0,05$). Die DNA-Fraktion scheint somit für die Stimulation der Phosphorylierung und des Thymidineinbaus in die DNA nicht verantwortlich zu sein.

Nach 2/3-Hepatektomie ist durch den Übergang der Hepatozyten aus der G_0 -Phase in die S-Phase innerhalb der ersten 24 Stunden mit einer Aktivitätssteigerung der Thymidinkinase als Vorbereitung auf die DNA-Synthese im proliferativen Stadium der Leberregeneration zu rechnen. Unbehandelte Kontrollen weisen im Regenerationsprozeß nach Teilhepatektomie eine hohe Phosphorylierungskapazität auf, die um 230 % über der Phosphorylierungsrate ruhender Hepatozyten liegt (Abb. 10/2). Bei teilhepatektomierten Tieren, die 24 Stunden vor und unmittelbar nach dem Eingriff mit je einer Dosie-

rungseinheit PIND-AVI behandelt wurden, ließ sich die Phosphorylierungsrate um weitere 32 % signifikant ($p < 0,05$ gegenüber 10/2) gegenüber unbehandelten Kontrollen steigern (Abb. 10/4). Diese Steigerungsrate entspricht dem Ergebnis, das auch an nicht regenerierenden Lebern erhalten wurde (Abb. 10/3).



VERTEILUNGSVERHÄLTNIS DER INTRAZELLULÄREN THYMIDINSTOFFWECHSELPRODUKTE
IN ABHÄNGIGKEIT VOM ZELLZYKLUSZUSTAND UND DER VORBEHANDLUNG BEI
EINER SUBSTRATKONZENTRATION VON 5 $\mu\text{MOL/L}$ DT

VERSUCHS- REIHE	N	NICHT-PHOSPHORY- LIERTES THYMIDIN	PHOSPHORYLIERTES THYMIDIN	DNA-INKORPORIERTES THYMIDIN
1	5	92.25 % $\pm$ 2.13	7.5 % $\pm$ 2.01	0.25 % $\pm$ 0.15
2	4	82.15 % $\pm$ 1.87 *	15.7 % $\pm$ 2.26 *	2.15 % $\pm$ 0.98 *
3	5	89.85 % $\pm$ 2.78	9.7 % $\pm$ 2.00	0.45 % $\pm$ 0.21
4	4	76.5 % $\pm$ 1.99 *	21.9 % $\pm$ 1.34 *	1.6 % $\pm$ 0.77 *
5	5	87.65 % $\pm$ 2.14 *	12.0 % $\pm$ 2.09 *	0.35 % $\pm$ 0.14
6	5	91.7 % $\pm$ 1.78	7.9 % $\pm$ 2.44	0.4 % $\pm$ 0.19
7	5	97.15 % $\pm$ 2.05 *	2.5 % $\pm$ 0.83 *	0.35 % $\pm$ 0.21

* = SIGNIFIKANT ($p < 0.05$) GEGENÜBER 1

Abb. 10: Veränderungen in den Mengenverhältnissen bei Thymidin, Gesamt-Thymidinphosphaten und DNA-fixiertem Thymidin in Abhängigkeit von Zellzykluszustand und Vorbehandlung.

unverändertes Thymidin
Gesamt-Thymidinphosphate
DNA-fixiertes Thymidin (Thymidin-Inkorporation)

3.2.2. Kinetische Konstanten der hepatozellulären Thymidinkinase

Gesteigerte Thymidinphosphorylierung nimmt ihren Ausgang von einer vermehrten Bildung von Thymidinmonophosphat. In ruhenden Hepatozyten ist die Bildung von Thymidinmonophosphat insgesamt gering; sie kann auf zwei Wegen erfolgen:

Auf dem direkten entsteht aus intrazellulär aufgenommenem Thymidin durch die Thymidinkinase TMP, wobei die erforderliche Phosphatgruppe aus einer ATP-Spaltung stammt. Die Thymidinkinase unterliegt in ihrer Aktivität zellzyklusabhängigen Schwankungen (59), mit niedrigen Aktivitäten in ruhenden Zellen (G_0 -arretierte Hepatozyten (60)) und deutlicher Aktivierung in der G_1 -Phase beim Übergang in die S-Phase (61).

Der indirekte Weg ist eine Umwandlung aus Ribocytidindiphosphat über mehrere Schritte (Abb. 3), deren Zwischenprodukte u.a. Desoxycytidindiphosphat und Desoxyuridindiphosphat sind, ehe nach Demethylierung von dUMP dTMP entsteht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Einfluß von PIND-AVI auf die Thymidinkinase-katalysierte Bildung von dTMP aus Thymidin bei unterschiedlichen Zellzyklus-Zuständen des Hepatozyten untersucht werden.

In jeweils vier bis sieben Versuchsansätzen wurden deshalb die kinetischen Konstanten zur Charakterisierung der Thymidinkinase in Hepatozyten bestimmt. In ruhenden Hepatozyten wird die maximale Umsatzgeschwindigkeit ($V_{\max}$) unter Silibinin- und PIND-AVI-Behandlung verdoppelt und damit auf den Wert teilhepatektomierter Lebern im Regenerationsmaximum gesteigert. Die Substrataffinität, die sich in der Michaelis-Konstanten (K_M) widerspiegelt, wird bei ruhenden Hepatozyten durch PIND-AVI nur gering, durch Silibinin deutlich beeinflußt. Unter Behandlung mit 16- α -PCN kommt es bei ruhenden Hepatozyten zu einem sechsfachen Anstieg von $V_{\max}$ gegenüber Kontrolle, gleichzeitig nimmt jedoch die Substrataffinität für das Enzym deutlich ab, gekennzeichnet durch einen starken Anstieg der K_M .

Bei regenerierenden Lebern zum Zeitpunkt maximaler DNA-Synthese nach 2/3-Hepatektomie ist bei unbehandelten Tieren die $V_{\max}$ doppelt so hoch wie in vergleichbaren ruhenden Lebern. Die K_M

liegt niedriger, was auf eine höhere Substratspezifität und -affinität des Enzyms schließen läßt. Unter PIND-AVI-Einfluß steigert sich die $V_{\max}$ auf das Vierfache der Kontrolle, gleichzeitig sinkt die Substratbindungskapazität unter Anstieg der K_M .

Tabelle 7 zeigt die kinetischen Daten der Thymidinkinase in verschiedenen Zellzykluszuständen und nach unterschiedlicher Vorbehandlung aus jeweils 5 Versuchen.

KINETISCHE PARAMETER DER THYMIDINKINASE

	Ruhende Hepatozyten				Regenerierende Hepatozyten	
	Kontrolle	16- α -PCN	Silibinin	PIND-AVI	Kontrolle	PIND-AVI
$V_{\max} \frac{\text{pmol TMP}}{\text{s} \cdot \text{mg Prot.}}$	601 $\pm$ 57	3747 $\pm$ 298	1325 $\pm$ 218	1182 $\pm$ 164	1241 $\pm$ 296	5380 $\pm$ 766
$K_M \text{ MOL/L}$	2,72 $\pm$ 0,18	4,49 $\pm$ 0,17	3,63 $\pm$ 0,15	3,15 $\pm$ 0,19	1,97 $\pm$ 0,07	2,93 $\pm$ 0,14

Tabelle 8 zeigt die Phosphorylierungsgeschwindigkeit v in Abhängigkeit von Zellzykluszustand und Vorbehandlung für eine Thymidinkonzentration von 0,5 $\mu\text{mol/l}$.

PHOSPHORYLIERUNGSGESCHWINDIGKEIT v DER THYMIDINKINASE BEI EINER SUBSTRATKONZENTRATION VON 0,5 $\mu\text{MOL/L}$ dT BEI :

Ruhenden Hepatozyten				Regenerierenden Hepatozyten	
Kontrolle	16- α -PCN	Silibinin	PIND-AVI	Kontrolle	PIND-AVI
93,22	374,70	160,41	161,92	251,21	784,26
$\pm$ 5,7	$\pm$ 11,3	$\pm$ 8,6	$\pm$ 11,9	$\pm$ 6,3	$\pm$ 15,2
	*	*	*		*

* signifikant gegenüber Kontrolle ($p < 0,05$); $n = 5$ bis 7

Aus diesen Veränderungen der kinetischen Eigenschaften der Thymidinkinase resultieren entsprechende Zunahmen der dTMP-Bildungsrate bei physiologischen dT-Konzentrationen. Entsprechend den Veränderungen an regenerierenden Leberzellen kann diese Stimulation als ein typisches frühes Merkmal des Übergangs des Hepatozy-

ten vom ruhenden in den regenerierenden Zustand betrachtet werden. Alle untersuchten Substanzen scheinen somit in der Lage zu sein, eine derartige Promotion ruhender Hepatozyten aus dem G_0 -Arrest in den Zellzyklus zu bewirken und dabei Vorgänge zu induzieren, wie sie in der späten G_1 -Phase beim Übergang zur S-Phase typisch ablaufen.

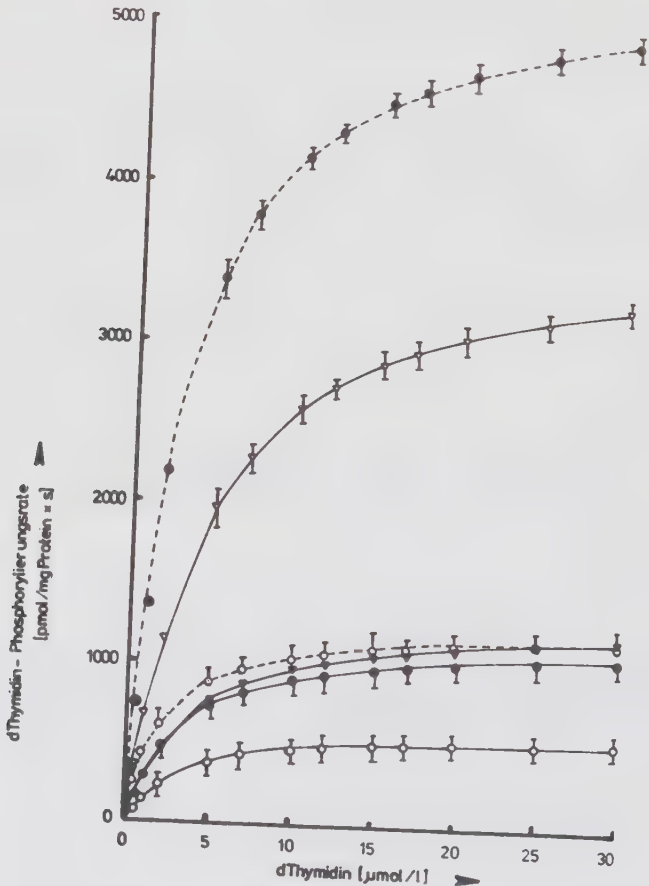


Abb. 11: Phosphorylierung von Thyminid in ruhenden (—) sowie in regenerierenden (---) Hepatozyten in Abhängigkeit von der Vorbehandlung:
 ○ ohne Vorbehandlung
 ▼ mit 16- α -PCN vorbehandelt
 ● mit 1 Dosis PIND-AVI vorbehandelt
 ▲ mit Silibinin vorbehandelt
 Dosierung siehe 5.1.4.

Die Ursache für diese Aktivitätssteigerung ist durchwegs in der Zunahme der $V_{\max}$ zu suchen, während die Veränderungen der K_M und damit der Substrataffinität von untergeordneter Bedeutung sind. Die stärker ausgeprägte Stimulation durch 16- α -PCN zeigt ferner, daß die Thymidinkinaseaktivität unter den gegebenen Regenerationsbedingungen noch nicht ihr Maximum erreicht hat und unter dem Einfluß geeigneter Stimuli noch weiter steigerungsfähig ist. Diese Tatsache kommt in der ausgeprägten Steigerung der dTMP-Bildung durch PIND-AVI in regenerierenden Zellen zum Ausdruck, wodurch zusätzlich die bereits an ruhenden Hepatozyten nachgewiesene Fähigkeit von PIND-AVI unterstrichen wird, präkursorische Prozesse für die DNA-Synthese zu induzieren (Abb. 11).

3.2.3. Thymidineinbau in die DNA von ruhenden und regenerierenden Hepatozyten und seine Beeinflussung durch PIND-AVI

Stimulation der Thymidinkinase und folgende Veränderungen im Phosphorylierungsmuster führen zu vermehrtem Angebot an Thymidinvorstufen der DNA-Synthese. Allgemein gilt der Einbau radioaktiv markierter Thymidinderivate in die DNA als eines der ersten Mitoseanzeichen (62). In der ruhenden Leber findet man durchschnittlich eine Mitose auf zehn- bis zwanzigtausend Hepatozyten. Deshalb ist die Einbaurate von ^3H -Thymidin in die DNA gering und wie Abb. 12 zeigt nur wenig von der angebotenen Substratkonzentration abhängig. Der Vorgang scheint in ruhenden Hepatozyten bereits bei den niederen physiologischen Konzentrationen unter 1 $\mu\text{mol/l}$ gesättigt zu sein.

Durch verschiedene Substanzen kann der Thymidineinbau in die ruhende Leber gesteigert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, daß durch den Leberinduktor 16- α -PCN in einer Dosierung von 150 mg/kg Körpergewicht in normalen Lebern eine geringe Steigerung der radioaktiven Markierung der DNA erreicht wird, die sich aber nur tendenziell abzeichnet und statistisch nicht signifikant ist.

Unter gleichen Bedingungen bewirkt die einmalige Applikation einer Dosierungseinheit PIND-AVI eine deutliche Steigerung der Thymidininkorporation, insbesondere bei physiologischen Konzen-

trationen unter $0,5 \mu\text{mol/l}$. Diese Einbaurrate ist konzentrationsabhängig sättigbar. Dieses Ergebnis ist zu sehen im Zusammenhang mit der fehlenden Konzentrationsabhängigkeit bei nicht-PIND-AVI-behandelten Tieren. PIND-AVI scheint den Thymidineinbau aus dem Stadium der Substratsättigung in ein mit regenerierenden Hepatozyten vergleichbares Stadium mit steigerbarer Thymidininkorporation zu führen. Versuche mit Thymus-DNA ergeben Werte, die sich von unbehandelten Kontrollen nicht unterscheiden.

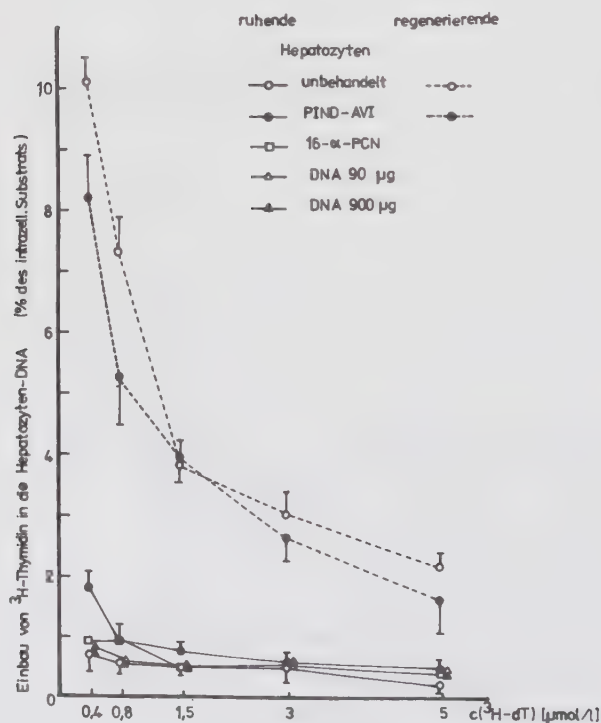


Abb. 12: Abhängigkeit des Thymidineinbaus in die DNA von der Substratkonzentration und seine Beeinflussung durch Zellzykluszustand und Vorbehandlung.

Lebern nach 2/3-Hepatektomie zeigen besonders bei niederen dT-Konzentrationen eine deutliche Steigerung des Nukleotideinbaus, der bei steigenden Konzentrationen angebotenen Thymidins einer Sättigung zustrebt. PIND-AVI kann unter diesen Bedingungen nahezu maximaler Proliferation keine Steigerung des Thymidineinbaus mehr auslösen; der unter PIND-AVI-Behandlung erzielte dT-Einbau verläuft annähernd identisch mit Kontrollen nach Teilhepatektomie ohne Behandlung.

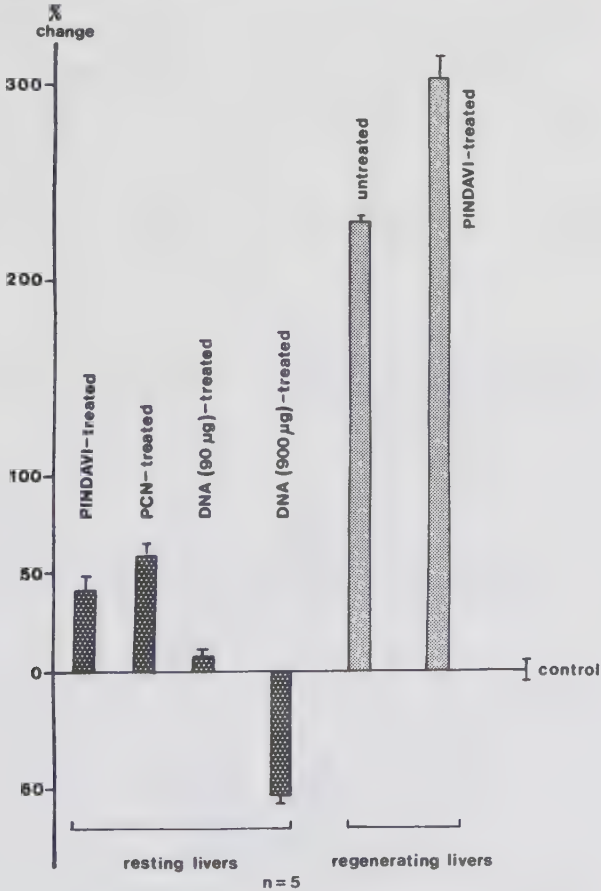


Abb. 13: Veränderungen in der Menge phosphorylierter Thymidinmetabolite einschließlich der DNA-Inkorporation gegenüber unbehandelten, lebergesunden Tieren (= Kontrollen)

Abb. 13 zeigt die Einflüsse von PIND-AVI, 16- α -PCN und Thymus-DNA sowie von unterschiedlichen Zellzyklus-Zuständen auf die Einbaurate von ^3H -Thymidin in die hepatozelluläre DNA bei einer angebotenen Substratkonzentration von 0,5 $\mu\text{mol/l}$.

Die Ergebnisse zu Phosphorylierung und DNA-Einbau von Thymidin zeigen, daß 16- α -PCN, Silibinin und PIND-AVI in der Lage sind, intrazellulär Prozesse auszulösen, die der DNA-Synthese voranlaufen und typisch für Leberzellen sind, welche die G_0 -Phase des Zellzyklus verlassen haben. Jedoch nur im Falle von PIND-AVI resultiert letztendlich aus diesen Vorbereitungsprozessen eine meßbare Erhöhung der DNA-Synthese und damit der Nachweis des tatsächlichen Übergangs ruhender Hepatozyten in die proliferative Phase. Eine solche Stimulation scheint jedoch nur unter der Voraussetzung einer submaximalen DNA-Syntheserate möglich zu sein, da in regenerierenden Hepatozyten trotz Steigerung der Phosphorylierungsprozesse eine weitere Erhöhung des Thymidineinbaus in die DNA nicht mehr induziert werden kann.

3.3. Charakterisierung des Thymidintransports als frühes Merkmal regenerativer Prozesse

Ähnlich der Thymidinkinase ist der Thymidintransport über die Plasmamembran ein Parameter, der vom Zellzyklus-Zustand abhängig ist. Die intrazelluläre Aufnahme erfolgt nach Ungemach und Hegner (57,63) über ein Transportsystem, das aus zwei Carriern mit etwa neunzigfachem Unterschied in ihrer Substrataffinität besteht. Das hochaffine System ist ein aktiver Transport mit hoher Substratspezifität, das in der Lage ist, Thymidin intrazellulär anzureichern. Über das niederaffine System erfolgt die Aufnahme unterschiedlicher Nukleoside in Form erleichterter Diffusion. Nach (56,63) ist das hochaffine System in AS-30-D- und Novikoff-Hepatomzellen nicht nachweisbar und scheint somit eine spezifische Eigenschaft ruhender Hepatozyten zu sein. Dies scheint sich auch darin zu bestätigen, daß eine Vorschädigung der Leberzelle in vivo mit Diethylnitrosamin das hochaffine Transportsystem und die intrazelluläre Anreicherung von Thymidin negativ beeinflusst, während die Vitalitätskriterien Trypanblau und intrazelluläres Kalium nicht verändert werden (57,64). Neben zellzyklusabhängigen Veränderungen wird der Thymidintransport in seiner Aktivität vom

physiko-chemischen Zustand der Plasmamembran beeinflusst (11) und eignet sich damit als integraler Membranparameter mit Aussagekraft über die Integrität der Plasmamembran als sensitives Vitalitätskriterium für isolierte Hepatozyten (65). In dieser Hinsicht weist der Thymidintransport gegenüber anderen Transportprozessen folgende Vorteile auf:

1. Es besteht keine Koppelung an andere energieverbrauchende Prozesse, z.B. Natriumgradient über die Plasmamembran.
2. In ruhenden Hepatozyten ist die Metabolisierung des Substrates vernachlässigbar gering (Abb. 3).
3. Das Substrat ist in den verwendeten physiologischen Konzentrationen nicht toxisch.

3.3.1. Die Konzentrationsabhängigkeit der initialen Thymidinaufnahme

Abb. 14 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der initialen Thymidinaufnahmerate in ruhenden Hepatozyten unter Kontrollbedingungen sowie beeinflusst durch PIND-AVI-Applikation. Die gesamte Thymidinaufnahme im physiologischen Bereich unter 20 $\mu\text{mol/l}$ läßt sich, wie auf S. 94 beschrieben durch folgende Gleichung darstellen:

$$v = \frac{v_T \cdot [S]}{[S] + K_T} + k \cdot [S] \quad (1)$$

Der Term

(2)

$$\frac{v_T \cdot [S]}{[S] + K_T}$$

entspricht der Aufnahmerate durch das hochaffine, sättigbare Transportsystem I, während der Term

$$k \cdot [S] \quad (3)$$

der Aufnahmerate im Bereich der praktisch linearen Phase im unteren Konzentrationsbereich des niederaffinen Transportsystems II entspricht.

Die durchgezogenen Linien (——) in Abb. 14 zeigen die gemessene und der Gleichung 1 folgende Gesamtaufnahme des Thymidins in ruhenden bzw. regenerierenden Hepatozyten und veranschaulichen den Einfluß von PIND-AVI (●) gegenüber unbehandelten Kontrolltieren (○). Die gestrichelten Linien (-----) stellen die nach Subtraktion des niederaffinen Anteils (Term 3) erhaltene Aufnahmerate des hochaffinen Carriers dar und entsprechen damit Term 2.

In ruhenden Hepatozyten wird die Gesamtthymidinaufnahme in physiologischen Konzentrationen durch PIND-AVI reduziert (Abb. 15). Bei unphysiologisch hohem Thymidinangebot ($>1000 \mu\text{mol/l}$) kann PIND-AVI die Gesamtaufnahme nicht signifikant steigern. Da ein Regenerationsprozeß und in der Folge proliferative Aktivität bei Hepatozyten gekennzeichnet ist durch eine Abnahme des hochaffinen Carriers (64), kann das bei ruhenden Hepatozyten erhaltene Ergebnis dahingehend interpretiert werden, daß die Hepatozyten unter PIND-AVI hinsichtlich der Thymidinaufnahme eine proliferationsanaloge Stoffwechsellage einnehmen und möglicherweise die G_0 -Phase des Zellzyklus verlassen. Die Interpretation wird dadurch gestützt, daß die Unterschiede insbesondere im Bereich niedriger Thymidinkonzentrationen auftreten, in denen der zellzyklusabhängige hochaffine Carrier optimal arbeitet und starken Einfluß auf die Gesamtaufnahme ausübt. Zusätzlich wird die Interpretation gestützt durch das Ergebnis, das an regenerierenden Hepatozyten erhalten wurde, da diese Zellen insgesamt auch im physiologischen Konzentrationsbereich eine deutlich geringere Aufnahmerate aufweisen, wobei jedoch beide Transportsysteme betroffen zu sein scheinen.

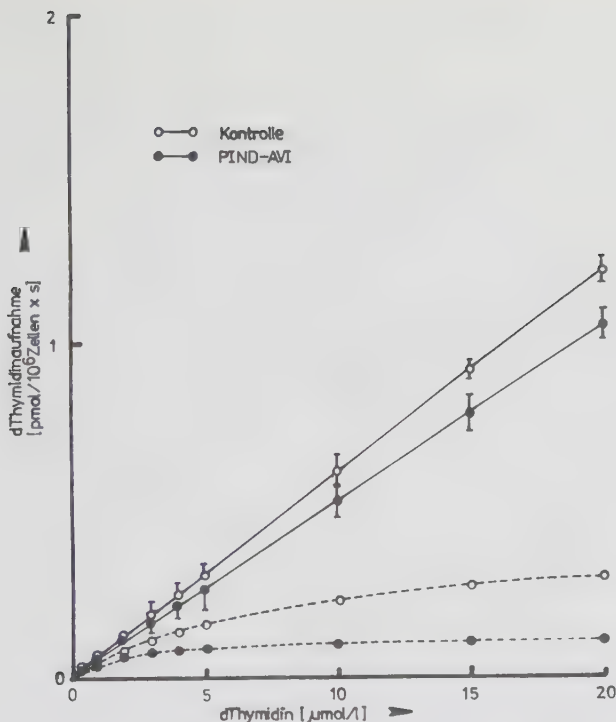


Abb. 14: Konzentrationsabhängigkeit der initialen Thymidinaufnahmerate in isolierten Hepatozyten von 3 Monate alten lebergesunden Ratten mit und ohne PIND-AVI-Stimulierung. ----- = Kinetik des high affinity carriers nach Korrektur des Aufnahmeanteils durch das low affinity System. $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$ aus 5 Versuchen.

In regenerierenden Hepatozyten dagegen bewirkt PIND-AVI eine Steigerung der Gesamtaufnahme (Abb. 15). Diese Erscheinung kann über den ganzen untersuchten Konzentrationsbereich von 0,5 bis 2000 $\mu\text{mol/l}$ festgestellt werden. Als Ursache wird diskutiert, daß unter PIND-AVI der niederaffine Carrier kaum verändert wird im Vergleich zu ruhenden Zellen unter PIND-AVI-Behandlung und damit PIND-AVI möglicherweise spezifisch regenerationsbedingte Veränderungen am niederaffinen Transportsystem verhindert. Dazu kommt, daß auch die Reduktion des hochaffinen Carriers unter PIND-AVI im regenerierenden Hepatozyten weniger stark ausgeprägt ist.

Eine gesteigerte Aufnahme in Folge PIND-AVI-induzierter vermehrter Phosphorylierung kann weitgehend ausgeschlossen werden, weil die Inkubationszeit für die Transportmessung mit 30 Sekunden sehr kurz ist und in diesem Zeitraum im Vergleich zur Gesamtaufnahme nur eine vernachlässigbare Phosphorylierung stattfindet.

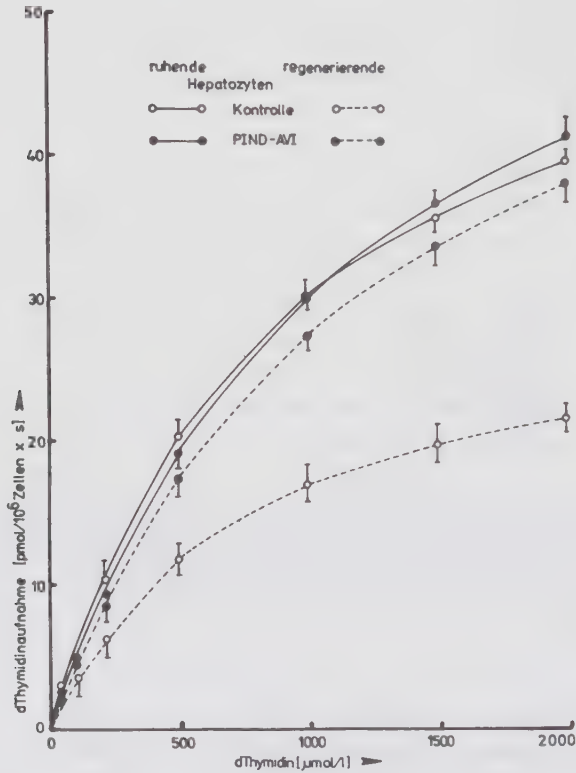


Abb. 15: Einfluß von PIND-AVI auf die Thymidinaufnahme ruhender und regenerierender Hepatozyten bei Substratkonzentrationen bis 2000 μmol/l. $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$ aus 5 Versuchen.

3.3.2. Kinetische Konstanten des hepatozellulären Thymidintransports

Tab. 9 stellt die kinetischen Konstanten des Thymidintransports vor. Dabei zeigen sich teilweise deutliche Unterschiede zwischen ruhenden und regenerierenden Hepatozyten, aber gleichermaßen auch zwischen PIND-AVI-Behandlung und Kontrollen, auf denen die unter 3.3.1. beschriebenen Veränderungen der konzentrationsabhängigen dT-Gesamtaufnahme beruhen. Der niederaffine Carrier wird durch PIND-AVI in den verschiedenen Zellzyklus-Zuständen des Hepatozyten wenig beeinflusst, nur bei unbehandelten regenerierenden Leberzellen zeigten sich Veränderungen, die sich auch auf die Transportkapazität im physiologischen Konzentrationsbereich auswirken (Tabelle 10).

Der hochaffine Carrier wird dagegen von Zellzyklusänderungen stark beeinflusst (56), so daß hier auch die eigentlichen Veränderungen zu erwarten waren. Sowohl nach PIND-AVI-Behandlung als auch nach 2/3-Hepatektomie kommt es zur Abnahme von K_T und V_T (Tabelle 9), so daß trotz gesteigerter Substrataffinität wegen des markanten Abfalls der Maximaltransportgeschwindigkeit schon bei physiologischen Konzentrationen eine verringerte Transportkapazität resultiert (Tabelle 10), wobei dieser Rückgang mit steigenden Konzentrationen noch ausgeprägter wird. Als Ursache für die V_T -Veränderungen kann neben einer Verringerung der Gesamtzahl der Carrierproteine auch eine Abnahme der Mobilitätskonstante des Carrier-Substrat-Komplexes in der Membran vermutet werden, da Änderungen dieser Konstante gleichsinnig in V_T und K_T eingehen. Ungemach beschreibt beide Gleichungen in (11).

$$K_T = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

$$V_T = k_3 \cdot C_{\text{tot.}}$$

k_3 : Mobilitätskonstante

C_{tot} : Gesamt-Carriermoleküle

Bei regenerierenden Hepatozyten bleiben unter PIND-AVI sowohl K_T als auch V_T unverändert. PIND-AVI kann somit bei Zellen, die nicht mehr in der G_0 -Phase sind und eine entsprechend hohe Proliferationskapazität erreicht haben, keine weiteren Veränderungen bewirken. Die Ähnlichkeit der Veränderungen des Thymidintransports ruhender Zellen durch PIND-AVI im Vergleich zu den Verhältnissen unter Regenerationsbedingungen stimmt mit den Befunden von Ungemach et al. (56) überein, daß die Abnahme der Aktivität des hochaffinen Carriers mit einer Zunahme der proliferativen Aktivität von Zellen korreliert. Das legt die Vermutung nahe, daß PIND-AVI bei ruhenden Hepatozyten Änderungen der Thymidinaufnahme bewirkt, wie sie unter proliferativen Bedingungen, z.B. während der Leberregeneration oder in Hepatomzellen (56) gefunden werden.

Tabelle 9

KINETISCHE PARAMETER DES THYMIDIN TRANSPORTIERENDEN SYSTEMS

	ruhende Hepatozyten		regenerierende Hepatozyten	
hochaffiner Carrier:	Kontrolle	PIND-AVI	Kontrolle	PIND-AVI
$V_T \frac{\text{pmol dT}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{s}}$	$0,44 \pm 0,057$	$0,12 \pm 0,019$ *1	$0,16 \pm 0,018$ *1	$0,20 \pm 0,026$ *1
$K_T \mu\text{mol/l}$	$9,00 \pm 0,132$	$2,08 \pm 0,111$ *1	$4,45 \pm 0,118$ *1	$3,25 \pm 0,125$ *1
niederaffiner Carrier:				
$V_T \frac{\text{pmol dT}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{s}}$	$57,4 \pm 0,76$	$66,5 \pm 0,56$	$29,7 \pm 0,35$ *1	$62,5 \pm 0,59$ *2
$K_T \mu\text{mol/l}$	$915,6 \pm 6,72$	$1238,6 \pm 5,12$	$758,3 \pm 4,99$	$1297,9 \pm 7,02$ *1

* signifikant p 0,05 gegenüber: 1 - Kontrolle ruhender Hepatozyten

2 - Kontrolle regenerierender Hepatozyten

Tabelle 10

KAPAZITÄT DES THYMIDIN TRANSPORTIERENDEN SYSTEMS BEI EINER KONZENTRATION VON $1 \mu\text{mol/l}$

	ruhende Hepatozyten		regenerierende Hepatozyten	
hochaffiner Carrier:	Kontrolle	PIND-AVI	Kontrolle	PIND-AVI
$v \frac{\text{pmol dT}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{s}}$	0,044	0,039	0,030	0,047
niederaffiner Carrier:				
$v \frac{\text{pmol dT}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{s}}$	0,063	0,054	0,039	0,048
Gesamttransportleistung				
$v \frac{\text{pmol dT}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{s}}$	0,107	0,093	0,069	0,095

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß PIND-AVI in der Lage ist, den Thymidinstoffwechsel von der Aufnahme über die Phosphorylierung bis zum Einbau in die DNA so zu verändern, wie es einem Übergang von Hepatozyten aus der G_0 -Arretierung in ein Stadium aktiven Wachstums entspricht.

3.4. Entwicklung des Lebergewichts

In den vorausgegangenen Versuchen war PIND-AVI in der Lage, den Thymidinstoffwechsel in einer Weise zu beeinflussen, die ähnlich der Situation in regenerierenden Lebern ist. Von Interesse war deshalb, den Einfluß von PIND-AVI und als Referenzsubstanzen von Silibinin und 16- α -PCN auf den Verlauf der Regeneration nach 2/3-Hepatektomie zu beobachten. Diese Versuche waren Teil einer Untersuchungsreihe über 4 Tage nach Teilhepatektomie während einer Behandlung mit PIND-AVI, Silibinin und 16- α -PCN. Zur nicht-hepatektomierten Kontrolle wurden Tiere einer gleichen Behandlung mit den Substanzen unterzogen, andererseits blieb eine Versuchstierpopulation nach Teilhepatektomie unbehandelt.

An gesunden Tieren wurde der Einfluß von PIND-AVI, Silibinin, 16- α -PCN und Tetrachlorkohlenstoff auf das Lebergewicht überprüft. Die verwendeten Konzentrationen sind unter 6.1.4. beschrieben. Neben PIND-AVI und Silibinin wurde das Steroidderivat 16- α -PCN als Vergleichsubstanz mit bekannter induzierender Wirkung auf die mischfunktionellen Oxygenasen in die Untersuchungen einbezogen (66). Mit Tetrachlorkohlenstoff sollten die Auswirkungen eines grundsätzlich anderen, gut charakterisierten Schädigungsmodells auf die Entwicklung des Lebergewichts mit untersucht werden.

Für die Versuche wurden den Tieren die Testsubstanzen intraperitoneal appliziert und 24 Stunden später das Lebergewicht bestimmt. Abb. 16 zeigt, daß innerhalb dieses Zeitraums das Lebergewicht unter dem Einfluß von PIND-AVI während der ersten 24 Stunden nach Applikation im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert blieb, während nach Silibinin und 16- α -PCN eine Gewichtsverminderung um durchschnittlich 10 % eintrat ($p < 0,05$). Tetrachlorkohlenstoff bewirkte einzig einen leichten Gewichtsanstieg um etwa 5 % (nicht signifikant). Die Gewichtsverminderung durch

Silibinin darf jedoch nicht überbewertet werden, da im Gegensatz zu Sonnenbichler et al. (67,68) nur nach dem Endzustand der Proteinsynthese mit einem relativ groben Parameter und nur zu einem Zeitpunkt geprüft wurde.

Zur Verlaufskontrolle nach 2/3-Hepatektomie wurden 24, 48 und 96 Stunden nach dem Eingriff die Organgewichte bestimmt. 24 Stunden vor und unmittelbar nach dem Eingriff wurden die Tiere mit Silibinin bzw. PIND-AVI behandelt, weitere Applikationen erhielten die Tiere nach jeweils 24 Stunden. Als Kontrollen galten Tiere, die an Stelle einer Testsubstanz 1 ml physiologische Kochsalzlösung i.p. erhielten.

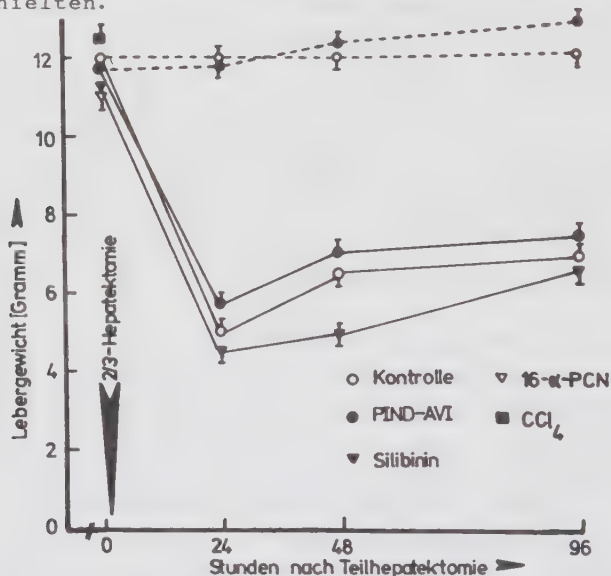


Abb. 16: Entwicklung des Lebergewichts unter dem Einfluß der Testsubstanzen PIND-AVI und Silibinin bei lebergesunden Tieren und nach 2/3-Hepatektomie. Vergleich mit dem Einfluß des Leberinduktors 16- α -PCN und dem Hepatotoxin CCl₄. Die Lebern wurden jeweils 24 h nach der letzten Wirkstoffapplikation entfernt, entblutet, abgetupft und gewogen. $\bar{x}$ + S.E.M. aus 4 bis 5 Versuchen. (----) nicht-hepatektomierte Tiere; (—) 2/3-hepatektomierte Tiere

Bei der viertägigen Überwachung zeigte sich, daß die Lebergewichtskurve bei den zweimalig mit PIND-AVI behandelten Tieren einen flacheren Verlauf nimmt. Zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Teilhepatektomie ist das Lebergewicht weniger stark abgefallen im Vergleich zur Kontrolle und liegt auch bis zu 96 Stunden stets oberhalb der Kontrollwerte. Die unterschiedlichen 24-Stunden-

Werte nach den verschiedenen Behandlungen können nicht ausschließlich auf Schwankungen des resezierten Lebergewebes zurückgeführt werden. Möglicherweise deutet sich hier bereits die beobachtete Entwicklung des Lebergewichts unter PIND-AVI-Behandlung über 4 Tage ohne 2/3-Hepatektomie als eine Erklärung an, wobei das Lebergewicht bis zum Versuchsende gegenüber dem Ausgangswert um durchschnittlich 12 % zunimmt ($p < 0,05$).

Silibinin-behandelte Tiere weisen während des gesamten Überwachungszeitraumes ein geringeres Lebergewicht als die Kontrollen auf. Zwischen 24 und 48 Stunden nach Teilhepatektomie ist der Gewichtsanstieg gegenüber Kontrollen deutlich verlangsamt. Zwischen 48 und 96 Stunden post operationem beschleunigt sich zwar die Lebergewichtszunahme, ohne jedoch den Kontrollwert oder gar die PIND-AVI-Werte zu erreichen (Abb. 16).

Tabelle 11

E N Z Y M	NORMALWERT	Einheit	LOKALISATION	ORGANSPEZIFITÄT	AUSSAGEKRAFT DER VERÄNDERUNG
Alkalische Phosphatase *	506 $\pm$ 26,7	U/l		Mucosa d. Duodenums, Knochen, Knorpel, Erythrozyten, Leber, Niere, Prostata, Milz, Leukozyt.	Erkrankungen des Skelettsystems, des hepatobiliären Systems - Cholestase-bösartige Knochentumore
Bilirubin	0,25 $\pm$ 0,02	mg/dl	endoplasmatisches Retikulum Konjugation "Mikrosomen"	Bildung in Milz, Kupferschen Sternzellen Leberzellen, Knochenmark	Prähepatischer Ikterus führt zum Anstieg nicht-konjugierten Bilirubins. Hepatischer Ikterus führt zum Anstieg konjugierten Bilirubins ebenso wie posthepatischer Ikterus
Cholesterin	81 $\pm$ 3,79	mg/dl		neben exogener Zufuhr durch tierische Nahrung endogene Synthese in Leber und Darmmukosa	Hypercholesterinämie bei biliärer Zirrhose; Hypocholesterinämie bei Anämie und verminderter Synthesekapazität
Cholinesterase *	150 $\pm$ 4,2	U/l	Serum	Bildung in der Leber, Sezernierung ins Blut	Abfall: verminderte Syntheseleistung der Leber durch ausgedehnte Schädigung des Leberparenchyms bzw. Verminderung der Leberzellen; Anstieg: bei Nephrosen
OT SAT	44 $\pm$ 2,7	U/l	Cytoplasma, Mitochondrien	Leber, Herzmuskel, Skelettmuskulatur	akute und chronische Hepatitis, toxische Leberschädigung, Herzinfarkt
PT LAT	37 $\pm$ 2,15	U/l	Cytoplasma	Leber	Hepatitis, Nekrosen, toxische Leberschäden
-GT	0,02 $\pm$ 0	U/l	Zellmembran	Niere, Pankreas, Leber Milz, Dünndarm	Hepatitis, Toxische Leberschäden, Metastasen-Leber, Verschlaußikterus
DH	1007 $\pm$ 139	U/l			Erkrankungen der Leber, des Blutes, Läsionen der Skelettmuskulatur, Tumore, Schock, toxischer Leberschaden

e mit * gekennzeichneten Werte entstammen eigenen Messungen an mindestens 5 ausgewachsenen, männlichen star-Ratten

3.5. Verlaufskontrolle "typischer" Leberenzyme im Serum

In Ergänzung der Untersuchungen zur Entwicklung des Lebergewichts wurden als Verlaufskontrolle der Leberzellschädigung und entsprechender reparativer Prozesse die Veränderungen der Muster verschiedener Serumenzyme untersucht, die in ihrer Kombination Rückschlüsse auf leberschädigende und in der Folge regenerative Vorgänge zulassen. Nach Dürr und Kraft (69) wird für die Verlaufskontrolle von Leberschädigungen bei Ratten folgendes Organprofil empfohlen: Alkalische Phosphatase, Bilirubin, GOT (ASAT), GPT (ALAT), G1DH und γ -GT (Tabelle 11).

Aktuelle Einzel-Zellschädigungen lassen die Spiegel von leicht ins Plasma übertretenden Enzymen (z.B. LDH, GPT) besonders ansteigen. Chronische Krankheitsstadien hinterlassen ihre Spuren vor allem bei solchen Enzymen, deren Synthese krankheitsabhängig veränderlich ist (z.B. CHE, GPT). Toxische Zellschäden zeichnen kein einheitliches Bild: Änderungen im Enzymmuster sind von der Noxe abhängig. Chlorierte Kohlenwasserstoffe bewirken als Ausdruck einer ausgedehnten Nekrose einen sehr hohen Anstieg der Transaminasen und der G1DH, während die CHE-Aktivität vermindert ist, als Zeichen reduzierter Syntheseleistung. Die Alkalische Phosphatase und die γ -GT werden wenig beeinflusst. Im Regelfall kehren die Enzymaktivitäten nach Ausheilung des Parenchymschadens auf ihre Normalwerte zurück (70).

Darüberhinaus sollte mit der Untersuchung der Leberenzyme an gesunden, aber PIND-AVI-behandelten Tieren festgestellt werden, ob die Induktion regenerationsähnlicher Vorgänge bei Thymidin-stoffwechsel und DNA-Synthese nicht doch als Folge einer Leberzellschädigung und einer dadurch bedingten Verminderung der Masse aktiven Leberfunktionsgewebes zu betrachten ist. Die meisten Stimuli der Leberregeneration, wie z.B. Aflatoxin oder Tetrachlorkohlenstoff sowie die 2/3-Hepatektomie reduzieren das Lebergewicht unter die "kritische Masse" und lösen dadurch auf der Basis der Theorie der Wachstumsfaktoren oder der Chalone Proliferationsprozesse aus (24). Interessant für neue Wege der Lebertherapie ist PIND-AVI aber nur, wenn sein Wirkprinzip nicht auf der weiteren Schädigung einer bereits vorgeschädigten Leber beruht, sondern auf den Mechanismen einer "untoxischen" Leberregeneration.

Tabelle 11 stellt die in diesem Zusammenhang untersuchten Enzyme hinsichtlich ihrer Normalwerte bei der Ratte, der zellulären Lokalisation, der Organspezifität und der Aussagekraft ihrer Veränderung zusammen.

3.5.1. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT, E.C. 2.6.1.1)

Abb. 17a zeigt die Beeinflussung der GOT-Serumaktivität durch verschiedene Vorbehandlungen der Ratten sowie eine Verlaufskontrolle der GOT-Aktivitäten über vier Tage nach Teilhepatektomie.

1. Ruhende Leber

PIND-AVI und Silibinin verändern die GOT-Aktivität praktisch nicht, wenn sie alle 24 Stunden verabreicht werden, während unter den gleichen Bedingungen 16- α -PCN einen 50 %-igen Anstieg der Serumaktivität bewirkt. Tetrachlorkohlenstoff als typisches leberschädigendes Agens läßt die GOT-Werte auf 250 % der Kontrolle ansteigen.

2. 24 Stunden nach Teilhepatektomie

Die 2/3-Hepatektomie mit ihrer massiven Entfernung funktionellen Lebergewebes bewirkt bei unbehandelten Tieren einen Anstieg der GOT-Aktivität auf das Sechsfache des Normwertes. Noch dramatischer ist der Anstieg unter sonst gleichen Bedingungen während Behandlung mit Silibinin: die GOT steigt auf das Zehnfache des Kontrollwertes. PIND-AVI dagegen bewirkt, daß die GOT als Marker massiver Einzel-Zellschäden nur auf das Dreifache der Kontrolle wächst und damit deutlich gegenüber anderen Maßnahmen den Anstieg mindert. Einzel-Zellschäden sind im Zuge des operativen Eingriffs zu erwarten durch die Manipulation der Leber während der Operation, den Operationsstreß und die Narkose, die Zellschädigung an der Schnittfläche und die funktionelle Überlastung des Restorgans nach Teilhepatektomie.

3. 48 Stunden nach Teilhepatektomie

Bei unbehandelten und Silibinin-behandelten Tieren beginnt die GOT zu fallen. Am deutlichsten ausgeprägt ist der Rückgang unter Silibinin, womit jetzt die geringsten GOT-Werte gemessen werden. Bei PIND-AVI-behandelten Tieren steigt die GOT weiter an, bleibt

aber deutlich unter der unbehandelten Tiere und liegt nur knapp (nicht signifikant) unter den Werten für Tiere, die mit Silibinin behandelt wurden.

4. 96 Stunden nach Teilhepatektomie

96 Stunden nach der 2/3-Hepatektomie haben sich die Enzymaktivitäten bei unbehandelten und PIND-AVI-behandelten Tieren normalisiert. Bei Silibinin-behandelten Tieren ist ein weiterer Rückgang der GOT-Serumaktivität zu beobachten; trotzdem werden die Normwerte noch immer um das Doppelte überschritten.

3.5.2. Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Alanin-Aminotransferase (ALAT, E.C. 2.6.1.2)

Wie Abb. 17a zeigt ist das von der GPT erhaltene Bild ähnlich dem der GOT, nur sind die Veränderungen stärker ausgeprägt.

1. Ruhende Leber

PIND-AVI-behandelte Tiere weisen gleich hohe GPT-Werte auf wie Kontrollen. Unter Silibinin kommt es tendenziell (nicht signifikant), unter 16- α -PCN deutlich zu einem GPT-Anstieg, der jedoch bei weitem übertroffen wird durch die Auswirkungen von Tetrachlorkohlenstoff auf den GPT-Spiegel. Nach CCl₄-Applikation steigt die GOT-Serumaktivität auf das 60-fache der Kontrollwerte an.

2. 24 Stunden nach Teilhepatektomie

Durch die 2/3-Hepatektomie kommt es bei unbehandelten Tieren zu einem starken Anstieg der GPT auf das 15-fache der Norm. Silibininbehandlung bewirkt über den gleichen Zeitraum sogar einen Anstieg auf mehr als das 36-fache der Kontrolle. Nur PIND-AVI vermag ebenso wie im Falle der GOT den fulminanten Anstieg erheblich zu vermindern. Die Werte steigen nur auf das Vierfache des Ausgangswertes und liegen so um 400 % unter den Werten unbehandelter Tiere; dabei ist dieser dämpfende Effekt wesentlich stärker ausgeprägt als bei der GOT.

3. 48 Stunden nach Teilhepatektomie

Nach der dramatischen Entwicklung des ersten postoperativen Tages tritt die Leber nun offensichtlich in die Phase der Restitution ein. Die enorm gesteigerten Enzymaktivitäten nehmen sowohl bei unbehandelten als auch in verstärktem Maße bei Silibinin-behandelten Tieren ab. Nur nach PIND-AVI-Behandlung weisen die Tiere noch einen Anstieg auf, der sein Maximum beim 7,5-fachen des Normalwertes findet. Damit liegt die Entwicklung aber noch immer weit unter den Spitzenwerten der anderen Versuchsansätze.

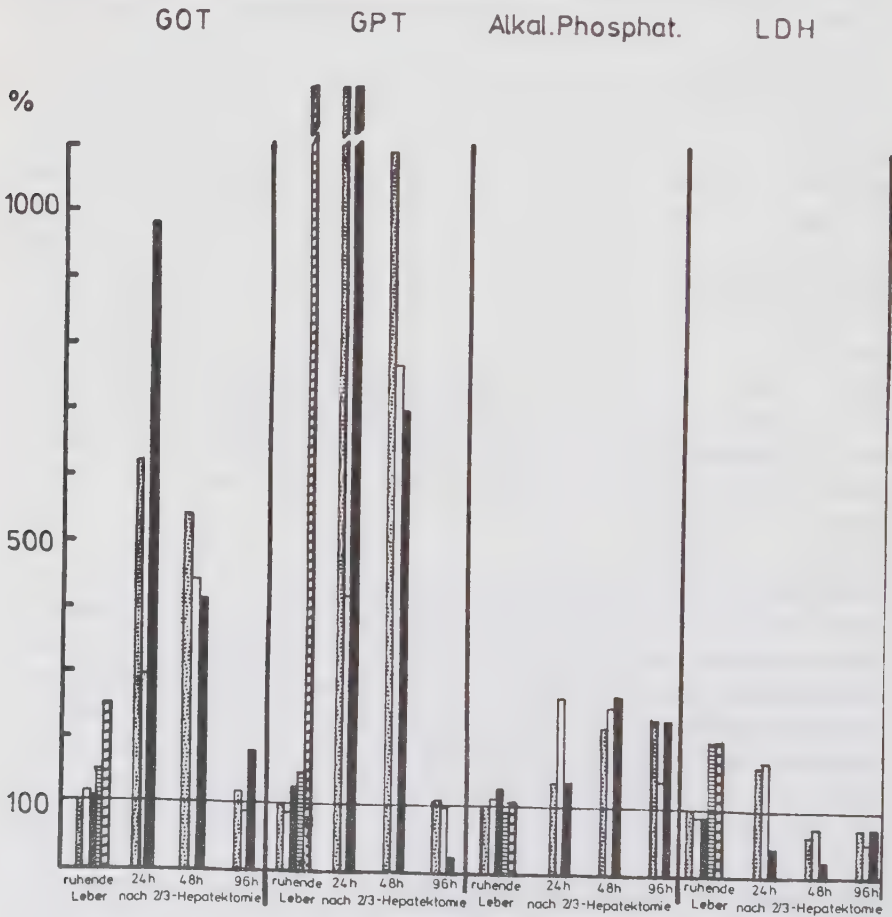


Abb. 17a: Vergleichende Gegenüberstellung der Verläufe typischer Leberenzyme über 4 Tage nach 2/3-Hepatektomie. Einfluß von PIND-AVI, Silibinin, 16- α -PCN und CCl_4 auf das Enzymmuster der ruhenden Leber. Die Durchschnittswerte bei lebergesunden, unbehandelten Tieren wurde gleich 100 % gesetzt und die Veränderungen dazu in Relation gebracht.

4. 96 Stunden nach Teilhepatektomie

Ähnlich der GOT hat sich am vierten postoperativen Tag die Enzymaktivität der GPT normalisiert. Sowohl bei unbehandelten als auch bei PIND-AVI-behandelten Tieren hat sich der Normalwert eingestellt. Bei Silibinin-behandelten Tieren ist im Gegensatz zur GOT die Aktivität deutlich unter den Kontrollwert gefallen.

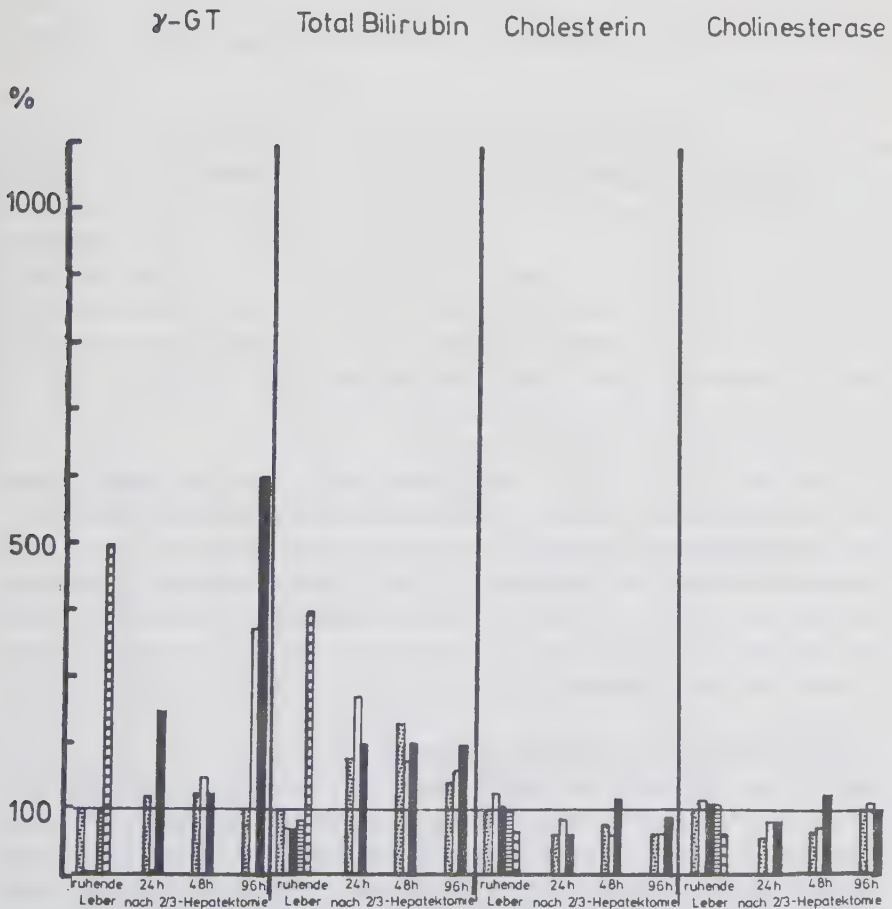


Abb. 17b: Erklärung siehe Legende zu Abb. 17a.

— Werte unbehandelter, lebergesunder Tiere (Kontrolle)

▨ Vorbehandlung mit Tetrachlorkohlenstoff

▩ Vorbehandlung mit 16- α -PCN

▤ Vorbehandlung mit Silibinin

▧ Vorbehandlung mit PIND-AVI

(n jeweils 4 bis 6)

3.5.3. Alkalische Phosphatase (AP, E.C. 3.1.3.1)

Da die AP nicht nur ein "funktionelles Leberenzym", sondern darüberhinaus auch Bestandteil von Zellen des retikuloendothelialen Systems und der Leukozyten ist, können Veränderungen in der Serumaktivität auch aus der Beeinflussung des Immunsystems kommen, wodurch sich unter Umständen gegenläufige Entwicklungen überlagern.

1. Ruhende Leber

Keiner der untersuchten Wirkstoffe konnte innerhalb 24 Stunden die AP verändern.

2. 24 Stunden nach Teilhepatektomie

Im Vergleich zu den Transaminasen sind die Veränderungen der AP nach Teilhepatektomie initial wesentlich geringer ausgeprägt. Unter Silibinin kommt es wie bei unbehandelten Tieren zu einem geringen Anstieg der AP. Nur der Immunmodulator PIND-AVI bewirkt einen deutlichen Anstieg der AP auf das Dreifache der Norm. Diese Entwicklung läßt u.U. an einen Zusammenhang mit anderen Zellen, wie Kupfferzellen oder Leukozyten denken.

3. 48 Stunden nach Teilhepatektomie

Die Serumaktivität bleibt unter PIND-AVI unverändert hoch, während nun auch unbehandelte Tiere einen starken Anstieg zu verzeichnen haben. Die Niveaus der AP-Aktivität liegen bei allen Versuchsansätzen jetzt etwa bei 300 % der Kontrolle. Dies legt den Schluß nahe, daß die infolge der Reduktion funktionellen Lebergewebes zu erwartende Cholestase einige Zeit zur Entwicklung braucht und jetzt einsetzt.

4. 96 Stunden nach Teilhepatektomie

Am vierten postoperativen Tag hat sich die AP unter PIND-AVI weitgehend normalisiert, während sich die Werte für Silibinin- und unbehandelte Tiere praktisch unverändert weiter auf hohem Niveau befinden, nämlich bei knapp dem Dreifachen der Norm. Die AP als Cholestase-anzeigendes Enzym zeigt bei ihrem schnelleren Abfall unter PIND-AVI, daß nicht nur der Gewebeersatz, sondern auch die Wiederherstellung der für die Gallebildung nötigen Zytarchitektur beschleunigt wird.

3.5.4. Lactat-Dehydrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27)

Ein Anstieg der LDH ist stets die Folge hypoxischer Stoffwechsel-lagen innerhalb von Zellen mit Verschiebungen beim intrazellulären Redoxpotential. Die Absolutwerte haben deshalb eine geringere Aussagekraft als die Veränderungen bestehender Niveaus.

1. Ruhende Leber

Die Aktivität der LDH wird weder von Silibinin noch von PIND-AVI beeinflusst. 16- α -PCN und CCl₄ verursachen einen gleichermaßen starken Anstieg auf das Doppelte der Norm.

2. 24 Stunden nach Teilhepatektomie

Nach Teilhepatektomie kommt es innerhalb der ersten 24 Stunden zu einem Anstieg der LDH bei unbehandelten wie bei PIND-AVI-behandelten Tieren, während Silibinin ein Abfallen der Serumaktivität bewirkt.

3. 48 Stunden nach Teilhepatektomie

Die Werte der LDH haben sich allgemein unterhalb des Normalwertes eingependelt. Am stärksten sinkt die Serumaktivität unter Silibinineinfluß (nur noch 30 % des Kontrollwertes).

4. 96 Stunden nach Teilhepatektomie

Die LDH-Aktivität im Serum steigt in Richtung Kontrollwert an, wobei der Anstieg bei unbehandelten und Silibinin-behandelten Tieren stärker ausgeprägt ist als bei den Tieren, die mit PIND-AVI im 24-Stunden-Rhythmus behandelt wurden.

3.5.5. γ -Glutamyl-Transferase (GT, E.C. 2.3.2.2)

Neben der AP zählt die GT zu den Cholestase-anzeigenden Enzymen. Zusammen mit den Transaminasen und der Cholinesterase erweitert sie die Möglichkeiten der Verlaufsbeobachtung als empfindlicher Indikator für Erkrankungen und Mitreaktionen der Leber. Darüberhinaus ist die Aktivität der GT abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen. Nach Hepatopathien normalisiert sich die GT zuletzt, so daß ihre Bestimmung sich vor allem zur Kontrolle einer klinischen Ausheilung hepatischer Erkrankungen eignet. Ein Sinken der GT-Aktivität bedeutet nach Schädigung des Leberfunktionsgewebes

zunehmenden Umbau der Leber und damit sinkende entzündliche Aktivität des Organs.

1. Ruhende Leber

Die bei Ratten ohnehin geringe GT-Aktivität im Serum sinkt bei Silibinin- und PIND-AVI-behandelten Tieren innerhalb von 24 Stunden auf die untere Nachweisgrenze ab. Mit 16- α -PCN konnte keine Veränderung gegenüber Kontrolle nachgewiesen werden. Das starke Leberzellgift CCl_4 bewirkt einen fünffachen Anstieg der GT gegenüber Kontrolle ($p < 0,05$).

2. 24 Stunden nach Teilhepatektomie

Nach Ablauf des ersten postoperativen Tages steigt die GT-Aktivität bei unbehandelten Tieren an; Behandlung mit Silibinin verdoppelt die Enzymaktivität im Serum gegenüber Kontrolle. PIND-AVI bewirkt auch einen Tag nach Operation keine meßbare GT-Aktivität.

3. 48 Stunden nach Teilhepatektomie

Die Enzymaktivität unbehandelter Tiere bleibt am zweiten Tag nach dem Eingriff leicht erhöht; unter Silibininbehandlung geht die Aktivität bis auf eine geringe Erhöhung (nicht signifikant) zurück. Bei PIND-AVI-behandelten Tieren kommt es mit eintägiger Verspätung zu einem relativ starken Anstieg, berücksichtigt man die vorbestehende Null-Aktivität, insgesamt ist die Aktivität aber nur minimal über den Normalwert erhöht.

4. 96 Stunden nach Teilhepatektomie

Bei unbehandelten Tieren stellt sich die GT auf den Normalwert ein. Bei fortgesetzter PIND-AVI-Behandlung steigt die Enzymaktivität stark an und erreicht 350 % der Kontrolle. Zu einem extremen Anstieg führt Silibinin am vierten postoperativen Tag: die dabei gemessenen GT-Werte steigen auf das Sechsfache über den Normalwert.

3.5.6. Totalbilirubin (indirektes und direktes Bilirubin)

Beim **prähepatischen Ikterus** kommt es zu einer Überschwemmung des hepatischen Konjugationsmechanismus durch indirektes Bilirubin aus Zellen des retikuloendothelialen Systems (Knochenmarks- und Milzzellen, Kupfferzellen) mit einem Anstieg von unkonjugiertem,

lipidlöslichem, toxischem Bilirubin. Der **hepatische Ikterus** ist gekennzeichnet durch den Rückfluß von konjugiertem Bilirubin in das Serum nach Schädigung parenchymatöser Zellen. Der **posthepatische Ikterus** wird ausgelöst durch einen Gallerückstau mit sekundärer Leberzellschädigung, wobei es gleichfalls zu einem Anstieg des direkten Bilirubins im Serum kommt.

1. Ruhende Leber

PIND-AVI, Silibinin und 16- α -PCN führen zu einem geringen Abfall des Gesamtbilirubins im Serum. Tetrachlorkohlenstoff löst durch toxische Leberzellschädigung einen dramatischen Anstieg von Bilirubin im Serum aus.

2. 24 Stunden nach Teilhepatektomie

Bei unbehandelten Tieren wirkt sich die Schwere des Eingriffs im Vergleich zum CCl_4 -Modell erstaunlich gering aus. Der Gesamtbilirubingehalt im Serum wächst nur um 70 % gegenüber dem Normalwert. Silibininbehandlung steigert das Totalbilirubin um 100 %, PIND-AVI löst sogar einen Anstieg um 200 % aus.

3. 48 Stunden nach Teilhepatektomie

Bei unbehandelten Tieren steigt das Gesamtbilirubin weiter an, bei Silibinintherapie bleiben die Werte unverändert hoch; PIND-AVI bewirkt am zweiten Tag nach 2/3-Hepatektomie einen deutlichen Rückgang des Bilirubinwertes.

4. 96 Stunden nach Teilhepatektomie

Sowohl bei unbehandelten Tieren wie solchen, die mit PIND-AVI behandelt wurden, ist der Bilirubingehalt im Serum nur noch gering erhöht, während Tiere mit wiederkehrender Silibininapplikation ein unverändert hohes Niveau des Bilirubinspiegels aufweisen.

3.5.7. Cholesterin

Da durch die pflanzliche Versuchstierdiät exogenes Cholesterin kaum als Quelle für den endogenen Cholesterinpool in Frage kommt, ist die Messung des Serumcholesteringehaltes ein sensitives Kriterium für die Bestimmung der Synthesekapazität der Leber.

1. Ruhende Leber

Weder Silibinin noch 16- α -PCN beeinflussen den Serumcholesterinspiegel. PIND-AVI bewirkt einen leichten, nicht signifikanten Anstieg, während Vorbehandlung mit Tetrachlorkohlenstoff erwartungsgemäß den Serumspegel senkt als toxische Verminderung der Syntheseleistung.

2. 24 Stunden nach Teilhepatektomie

Am ersten postoperativen Tag sinkt der Serumspegel sowohl bei unbehandelten Tieren wie bei solchen unter Silibinineinfluß signifikant unter den Kontrollwert. PIND-AVI ergibt einen weniger ausgeprägten Rückgang, der im Schwankungsbereich des Normalwertes liegt.

3. 48 Stunden nach Teilhepatektomie

Bei unbehandelten wie bei Silibinin-behandelten Tieren steigt der Serumcholesterinspiegel wieder an. Mit Silibinin wird der Normalwert gut erreicht. PIND-AVI-behandelte Tiere weisen weiter einen fallenden Cholesterinspiegel auf, was auf eine verzögert einsetzende Synthesehemmung hinzuweisen scheint.

4. 96 Stunden nach Teilhepatektomie

Am vierten postoperativen Tag schwankt allein der Cholesterinspiegel Silibinin-behandelter Tiere im Normalbereich. Unbehandelte und PIND-AVI-behandelte Tiere zeigen einen deutlich geringeren Cholesterinspiegel im Serum als es der Norm entspricht.

3.5.8. Cholinesterase (CHE, E.C. 3.1.1.8)

Die CHE, aus 13 Isoenzymen bestehend, weist auf die Syntheseleistung der Leber hin. Da die Leber über große Reserven des Enzymsystems verfügt, sinkt die CHE-Aktivität erst bei ausgedehnten Schädigungen des Leberparenchyms bzw. großem Leberzellverlust.

1. Ruhende Leber

PIND-AVI, Silibinin und 16- α -PCN nehmen praktisch keinen Einfluß auf die CHE-Aktivität im Serum. Erwartungsgemäß mindert der toxische Leberparenchymschaden durch Tetrachlorkohlenstoff die CHE-Aktivität auf die Hälfte des Normwertes.

2. 24 Stunden nach Teilhepatektomie

Durch den großen operativen Verlust von funktionellem Lebergewebe kommt es allgemein zu einem Verlust an Enzymaktivität, der bei unbehandelten Tieren stärker ausfällt als bei solchen, die mit PIND-AVI oder Silibinin behandelt worden waren.

3. 48 Stunden nach Teilhepatektomie

Bei unbehandelten und PIND-AVI-behandelten Tieren ist die CHE-Aktivität noch deutlich gegenüber Kontrolle gemindert, während Silibinin-behandelte Tiere wieder über normale Serumaktivität verfügen.

4. 96 Stunden nach Teilhepatektomie

Die Normalwerte der CHE-Aktivität haben sich bei unbehandelten wie auch bei behandelten Tieren wieder eingestellt.

Auf eine Auswertung der Ergebnisse, die bei der Analyse der GLDH-Aktivitäten erhalten wurden, mußte verzichtet werden, weil jede untersuchte Tierpopulation in zwei annähernd gleich große Gruppen mit unterschiedlicher GLDH-Aktivität zerfiel. Die eine Gruppe wies Enzymaktivitäten in der Größenordnung um 10 U/l auf, während die Enzymaktivität der anderen Gruppe jeweils um den Faktor 100 höher lag.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß PIND-AVI bei ruhenden Hepatozyten keine Veränderungen im Enzymmuster auslöst, die auf ein toxisches Geschehen schließen lassen. Die Verlaufskontrollen nach 2/3-Hepatektomie zeigen, daß unter PIND-AVI-Einfluß dramatische Entgleisungen der Serumenzym Spiegel gemindert werden. Die Folgen einer massiven Schädigung scheinen sowohl bei synthese- wie auch clearance-anzeigenden Enzymen offensichtlich gemindert zu werden. Dieser Effekt könnte auf eine untoxische Stimulierung restlichen intakten Leberfunktionsgewebes zurückzuführen sein.

Silibinin zeigt an der ruhenden Leber gleichermaßen keine toxische Aktivität. Nach massiver Reduzierung von Leberzellen vermag es jedoch nicht die Funktionen verbleibender Hepatozyten zu steigern und dabei Entgleisungen typischer Leberenzymmuster zu verringern.

16- α -PCN bewirkt bereits bei lebergesunden Tieren meßbare Veränderungen im Enzymmuster, die auf Eigentoxizität der Substanz schließen lassen. Dies legt die Vermutung nahe, daß der stimulierende Effekt des Wirkstoffs ähnlich wie bei Phenobarbital auf toxische Prozesse zurückzuführen ist.

4. Stimulierung der immunologischen Aktivität von Kupfferschen Sternzellen durch PIND-AVI

4.1. Beschreibung der Kupfferschen Sternzellen

Die Kupfferschen Sternzellen gehören als Bestandteil des retikuloendothelialen Systems (RES) zu den Makrophagen. Als solche sind sie wichtig bei der Phagozytose, der Immunantwort, beim Intermediärstoffwechsel von Eisen und Lipiden sowie bei der Sekretion von Pyrogenen, CSF, Collagenase, Complement und Erythropoietin (71). Die Kupfferzellen spielen eine Hauptrolle bei der Clearance von Bakterien und Kolloiden aus dem Blutstrom. Tennent und Donald (72) konnten zeigen, daß nach Zymosanstimulierung zwei Phasen der Colloidclearance auftreten. Nach zwei Stunden beginnt eine erste Phase mit starker Beteiligung der Blutplättchen, nach 72 Stunden kommt es zu einer zweiten Clearanceweile mit Beteiligung hyperphagocytotischer Kupfferzellen.

Wie bei anderen Makrophagen ist die Zellwand aus Mucosubstanz noch von einer Proteinschicht überlagert (73). In der Zellmembran sind Fc- und C-3-Rezeptoren gegenwärtig und die Partikelaufnahme ist ein energieabhängiger Prozeß, wobei Actin-ähnliche Mikrofilamente des Cytoplasmas beteiligt sind.

Eine besondere Bedeutung kommt den Kupfferzellen beim Schock zu, sind sie doch in der Lage, Mikrothromben, Bakterien, Endotoxine, Blutplättchenaggregate und lysosomale Enzyme aus der Blutbahn zu entfernen (74).

Obwohl eine minimale Wanderung der Kupfferzellen entlang der Sinusoide nicht ausgeschlossen wird, gelten sie allgemein als residente Makrophagen der Leber. Die Fähigkeiten der Kupfferzellen zur Immunantwort gelten als begrenzt. Nach der i.v.-Injektion einer T-4-Bakteriophagen-Suspension steigt die Konzentration in der Leber auf das 12-fache der Milz, aber antigenhaltige Kupfferzellen synthetisieren nicht mehr Antikörper.

Die Immunogenität von Kupfferzell-RNA ist geringer als die von Peritonealmakrophagen (75). Eine antigen-induzierte Mitose von Kupfferzellen konnte jedoch bei immunisierten Mäusen nachgewiesen

werden (76).

Bei der Clearance von Antigenen aus dem Darm sind Kupfferzellen von großer Bedeutung. Thomas et al. fanden bei experimenteller Leberzirrhose mit reduzierter Clearancefunktion ein Durchbrechen von Antigenen aus dem Darm in die Milz. Mit der verminderten Entgiftung von Endotoxinen mag auch die regelmäßig bei Leberzirrhose auftretende Hypergammaglobulinämie wenigstens teilweise in Zusammenhang stehen (77, 78). Bradfield bezeichnet die Funktion der Kupfferzellen zu Phagozytieren ohne mit Antikörperbildung antworten zu müssen als "control of spillover" (79), also als Schutzmechanismus vor überschießender Einschwemmung von Antikörpern mit nachfolgender Immunantwort.. Es ist möglich, daß ein Versagen dieses Kontrollmechanismus bei überschießendem Endotoxin Ursache ist für eine Verbrauchskoagulopathie.

Kupfferzellen sind zur Lyse von Erythrozyten befähigt und überführen dabei aufgenommenes Eisen in Ferritin (80). Der Intermediärstoffwechsel der Kupfferzellen ist besser bekannt als der anderer Makrophagen: Sie metabolisieren Steroide (80) und acetylieren Sulfonamide (81). Ähnlich den Hepatozyten synthetisieren sie Harnstoff, binden Insulin und bauen es ab (82). Wie andere mononukleäre Zellen sezernieren kultivierte Kupfferzellen Zellproliferationsfaktoren für in Kultur gehaltene Granulozyten- und Monozytenkolonien (83).

Die Bedeutung der Kupfferzellen bei der Kontrolle neoplastischer Prozesse ist umstritten. Obwohl sie unter bestimmten experimentellen Bedingungen in der Lage sind, Tumorzellen zu phagocytieren, kann man schwerlich an eine bedeutende Rolle dabei glauben, zählt doch die Leber zu den Organen mit der höchsten Inzidenz von Sekundärtumoren (71).

4.2. Hepatische Phagocytose und Immunantwort

Nachdem die Leber durch ihre zentrale Lage eine besondere Verantwortung trägt beim Schutz des Organismus vor Schadstoffen, kommt einer kooperativen Interaktion zwischen Hepatozyten und Sinusoidalzellen eine besondere Bedeutung zu. Mit in vorderster Linie bei der Abwehr von Toxinen aus dem Intestinum stehen die

Kupfferzellen. Ihre Hauptaufgabe ist die Phagocytose und anschließende "Verdauung" aufgenommener Partikel durch lysosomale Aktivität. Die Phagocytose erstreckt sich in der Hauptsache auf Bakterien, Liposomen, Erythrozyten, Latex- und Tuscheartikel und ist energieabhängig (84). Darüberhinaus sezernieren Sternzellen biologisch aktive Stoffe, welche die Lymphozytenaktivität beeinflussen und solche, die in das Komplementsystem eingebunden sind. Kupfferzellen zeigen verschiedenartige Reaktionen auf Stimulation. Experimentell konnte man durch Estrogen, Endotoxine, Glucan, Zymosan, Triolin und BCG eine Stimulation nachweisen, die sich in erhöhter Serum-Lysozym-Aktivität niederschlägt (84). Schädigung von Hepatozyten durch Hepatitis oder Tetrachlorkohlenstoff-Intoxikation bewirkt in besonderem Maß eine Stimulation. Dabei kann die Freisetzung von zellulären Bestandteilen aus nekrotischen Hepatozyten, möglicherweise Peptide, eine besondere Rolle spielen.

Eine weitere Reaktion der Kupfferzellen ist die Drosselung ihrer Aktivität, im Extremfall bis hin zur völligen Blockade. Dies äußert sich in einer herabgesetzten Clearance von Substanzen, wie z.B. aggregierten Proteinen. Auslöser solcher Reaktionen sind zumeist Stoffe, welche die Plasmamembran verändern, wie z.B. Heparin, Gallensäuren, Alkohol, Galactosamin aber auch Leberzellschädigung. Dabei folgt die Blockade der Stimulation. Die Blockade der Clearancefunktion bewirkt eine Überschwemmung des lymphoiden Systems und der Milz mit Antigenen. Dies löst eine systemische Immunreaktion aus.

Die dritte Reaktion der Kupfferzellen auf äußere Einflüsse ist die Nekrose, ausgelöst beispielsweise durch das cytotoxische Froschvirus FV-3 oder toxische Substanzen wie Allylformiat oder hohe Gallensäurekonzentrationen.

Ein Hauptproblem, das noch lange nicht gelöst ist, ist der Unterschied zwischen Kupfferzellen und anderen Makrophagen, z.B. aus dem Peritoneum, der Milz und dem Knochenmark. Sie alle haben vieles gemeinsam bezüglich Morphologie und Verhalten. Ihre Form ist variabel, aber zumeist sternförmig und sie zeigen eine positive Peroxidaserreaktion. Sie sind autonom zur Proliferation befähigt und bedürfen keiner präcursorischen Zellen (85). Ähnlich den

Makrophagen aus Blut (86) sind Kupfferzellen in der Lage als Effektorzellen immunspezifisch bei der Tumorbekämpfung zu agieren, aber auch nicht-immunologisch cytostatisch oder cytozid zu wirken (87). Roos und Dingemans fanden darüberhinaus, daß Kupfferzellen gegenüber bestimmten Tumorzelllinien phagocytotisch stark aktiv sind, andere hingegen kaum angreifen (86). In den Antitumoreigenschaften solcher solider Makrophagen bestehen Möglichkeiten für die Bekämpfung von auf dem Blutweg herangetragenen Lebermetastasen. Roos und Dingemans untersuchten die phagocytotische Aktivität von Kupfferzellen der Maus gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien und fanden unabhängig von der absoluten Phagocytoseaktivität stets ein Phagocytosemaximum bei 30 min. nach Tumorzelleinschwemmung in die isoliert perfundierte Leber.

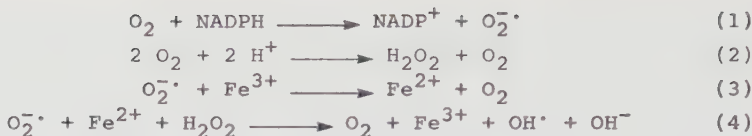
DiLuzio untersuchte den Einfluß stimulierender Agentien biologischen Ursprungs auf die durch Phagocytose bedingte Hemmung der Metastasenbildung in der Leber. Stimulantien bakteriellen Ursprungs, wie das Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) und Corynebacterium parvum steigern die Aktivität des RES, haben aber den Nachteil starker Antigenität, schwieriger Standardisierbarkeit und unbekannter Stoffwechselprodukte. Auf den Forschungen von Benacerraf und Sebestyen (88) aufbauend, die mit der Zymosan genannten Zellwandpräparation aus Saccharomyces cerevisiae eine RES-Stimulierung erzielten, suchten DiLuzio und Mitarbeiter nach der ursächlichen Komponente im Zymosan. Sie fanden das wirksame Prinzip im Glucan, einer Polyglucopyranose mit β -1 $\rightarrow$ 3-glucosidischer Verknüpfung (89). Für Glucan wurde neben einer Steigerung der Phagocytose und damit der intravaskulären Clearance und hepatischen Aufnahme von Kolloiden und Partikeln (90) eine Steigerung der zellulären (91) und humoralen (92) Immunantwort gefunden. Darüberhinaus aktiviert Glucan sowohl die klassischen als auch die alternativen Biosynthesewege des Komplements (93) und induziert die Proliferation von Monozyten der Leber und Milz (94). DiLuzio fand, daß die tägliche intravenöse Glucanapplikation an drei Tagen hintereinander bei Mäusen zu einer Hypertrophie der Milz, der Leber und der Lunge führte, die mit einem hyperphagocytotischen Status über weitere 10 Tage einherging (95). Bei weiteren Versuchen dazu ergab sich eine deutliche Zeit- und Dosisabhängigkeit der Wirkung von appliziertem Glucan (96). DiLuzio faßt Substanzen wie Glucan, BCG, Corynebakterium parvum, Pyrano-

polymer und Zymosan unter dem Begriff "Activin" zusammen und definiert dabei "Activin" wie folgt: Es handelt sich dabei um nicht zytotoxische Agentien, die eine unspezifische Widerstandskraft des Zielorganismus gegenüber verschiedenen Krankheitsprozessen, insbesondere bakterielle, virale oder fungale Infektionen sowie Immunschwächenstörungen und Neoplasie bewirken - Überwiegend durch Makrophagen bedingte Ereignisse. Diese Definition von Activin gleicht stark der von Mayr (6) gewählten Definition für Paramunitätsinducer.

Nachdem Kupfferschen Sternzellen während pathologischer Prozesse in der Leber eine besondere Bedeutung zukommt, schien es interessant, die Wirkung des Paramunitätsinducers PIND-AVI auf die Kupfferzellfraktion der Rattenleber zu untersuchen und in den Test die Wirkung eines eingeführten Handelspräparates zur Therapie hepatischer Erkrankungen (Silibinin, Legalon) auf die Sternzellen mit einzubeziehen.

4.3. Chemilumineszenzmessung an aktivierten Makrophagen

Weidenmann und Mitarbeiter beschreiben die Chemilumineszenzmessung als geeignetes Kriterium für die Bestimmung der Makrophagenaktivität nach Anregung durch phagocytotische oder nicht-phagocytotische Stimuli (97, 98). Ihre Beobachtungen machten sie an Granulozyten, Knochenmarksmakrophagen, Thymozyten und Vollblut (99) sowie Peritonealmakrophagen (100). Der Mechanismus ist in allen Fällen derselbe. Bahior (101, 103) und Badwey (102) fassen den Reaktionsablauf wie folgt zusammen: Der Kontakt von Makrophagen mit mitogenen Stimuli bewirkt einen erhöhten Sauerstoffverbrauch dieser Zellen unter gleichzeitiger Bildung aktiver Sauerstoffspezies. Molekularer Sauerstoff wird dabei von NADPH zum Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$ reduziert, welches weiter zu H_2O_2 disproportioniert. Daneben entstehen durch Interaktion der aktiven Sauerstoffmoleküle das Hydroxylradikal $OH^{\cdot}$ und Singulett-sauerstoff 1O_2 .



Gleichung (4) stellt die durch Übergangsmetalle katalysierte Haber-Weiss-Reaktion dar.

Abbildung 18 veranschaulicht den Mechanismus der Bildung aktiver Sauerstoffspezies nach Kontakt einer immunkompetenten Zelle mit einem Mitogen.

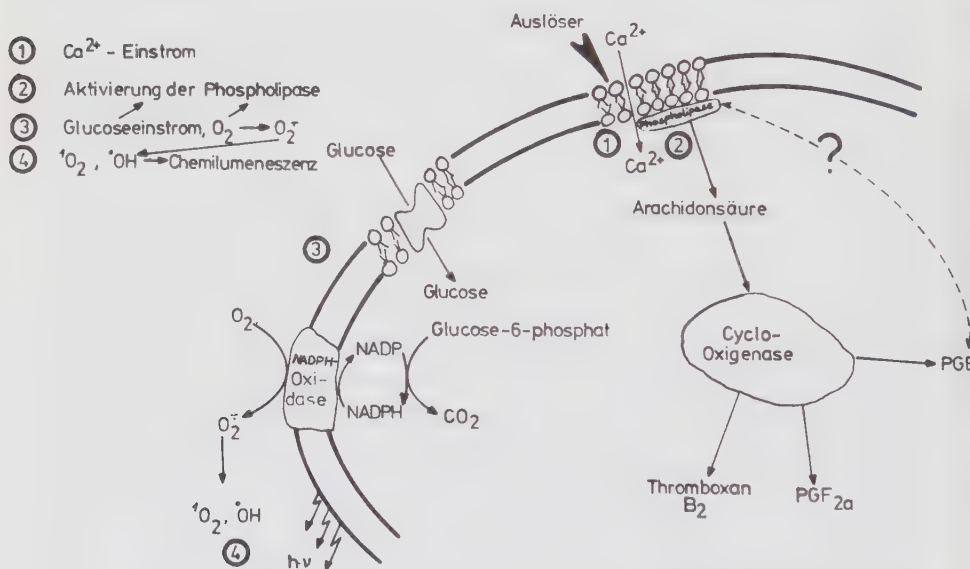


Abb. 18: Schematische Darstellung der zellulären Produktion aktiver Sauerstoffspezies im Anschluß an einen mitogenen Stimulus. Die Freisetzung der aktiven Sauerstoffspezies bewirkt die Chemilumineszenz an der Zellmembran immunkompetenter Zellen, die durch geeignete chemische Zusätze zum Zellansatz verstärkt werden kann. vgl. hierzu auch Abb. 19 (nach 104)

Abbildung 19 zeigt vereinfacht die entstehenden unterschiedlichen Formen des aktivierten Sauerstoffs (nach 104).

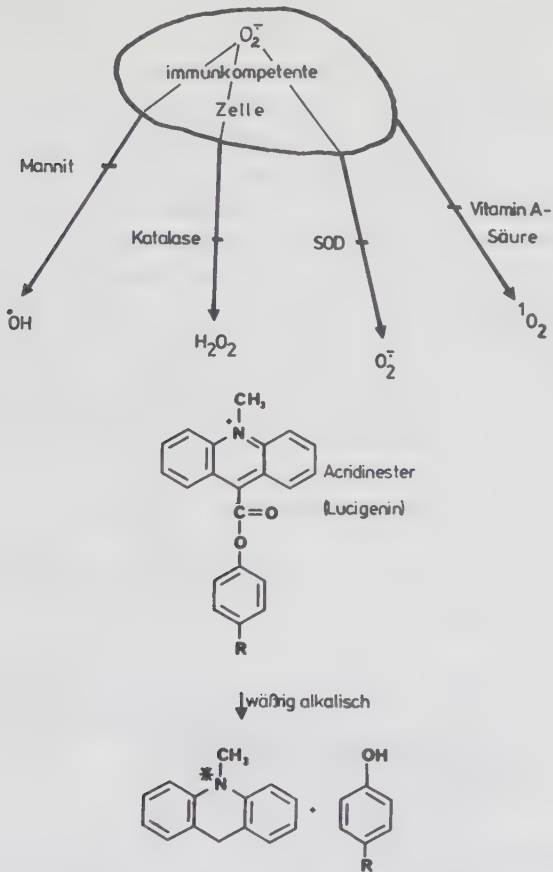


Abb. 19: Die Entstehung der 4 aktiven Sauerstoffspezies kann spezifisch durch Hemmstoffe unterbunden werden. Ihre Existenz wird durch den Fluoreszenzverstärker Lucigenin in Form von Biolumineszenz (Chemilumineszenz) nachgewiesen.

Parnham und Bittner (100) untersuchten normale und durch *Corynebacterium parvum* aktivierte Peritonealmakrophagen von Mäusen. Die isolierten Zellen wurden *in vitro* stimuliert mit opsoniertem Zymosan, Phorbolmyristatacetat oder Leukotrien B-4 und die Luminal-verstärkte Chemilumineszenz bestimmt. In allen Fällen hemmten Prostaglandin PGE_2 und Prostacyclin (PGI_2) die Chemilumineszenzreaktion. Bei nicht-aktivierten Makrophagen bewirkte Indometacin eine Steigerung der Chemilumineszenz durch Hemmung der PGE_2 -Bildung aus Arachidonsäure, während bei *C.parvum*-aktivierten Makrophagen eine Abnahme der Chemilumineszenz nach Indometacininkubation festzustellen war. Die Autoren diskutieren für dieses Phänomen sowohl einen negativen Feedback-Mechanismus von PGE_2 und PGI_2 auf immunologisch aktivierte Zellen als auch Scavenger-Eigenschaften des Indometacins für Hydroxyl- oder Superoxidationradikale. So scheint also ein Zusammenhang zu bestehen zwischen Menge und Art von Arachidonsäuremetaboliten und der cytotoxischen Aktivität von Makrophagen durch aktive Sauerstoffspezies.

Die in der Literatur beschriebenen und aufgeführten Argumente

- a. für eine Beteiligung der Kupfferschen Sternzellen am regenerativen Geschehen der Leber,
- b. für das allgemeine biologisch-chemische Verhalten aktivierter Makrophagen und anderer immunkompetenter Zellen

ließen es untersuchenswert erscheinen,

- a. ob die für Makrophagen im allgemeinen getroffenen Feststellungen zur Bildung und zum Nachweis von nach Stimulierung vermehrt freigesetzten aktiven Sauerstoffspezies ("burst of oxygen") auch auf Kupffersche Sternzellen, also residente Makrophagen der Leber, übertragbar sind;
- b. ob als Lebertherapeutika verwendbare Substanzen, insbesondere PIND-AVI und Silibinin (Legalon) neben ihrem Einfluß auf das Leberparenchymgewebe auch eine mit der Chemilumineszenzmessung nachweisbare Veränderung an immunkompetenten nicht-parenchymatösen Leberzellen hervorrufen.

4.4. Eigene Messungen

4.4.1. Einfluß von PIND-AVI bzw. Silibinin auf in vitro kultivierte Kupfferzellen männlicher Ratten

Für diese Versuchsreihe wurden männliche Wistarratten im Alter von zwei Monaten und einem Gewicht von etwa 200 g verwendet. Nach Isolierung der Kupfferzellen und Vorinkubation bei 37°C wurden je 10^6 Zellen zu der im Biolumat vorgewärmten Reaktionslösung gegeben und die Meßreihe sofort gestartet. Von den sechs parallel durchgeführten Einzelmessungen waren jeweils zwei Kontrollen ohne Zusatz einer Testlösung, zwei enthielten je 100 µl gelöstes PIND-AVI und zwei weiteren Ansätzen waren je 20 µl Silibinindi-hemisuccinat-Lösung (16 mg/ml in PBS) zugesetzt. Die Chemilumineszenz der Kontrollen wurde gleich 100 % gesetzt und die der Testansätze dazu in Relation gebracht.

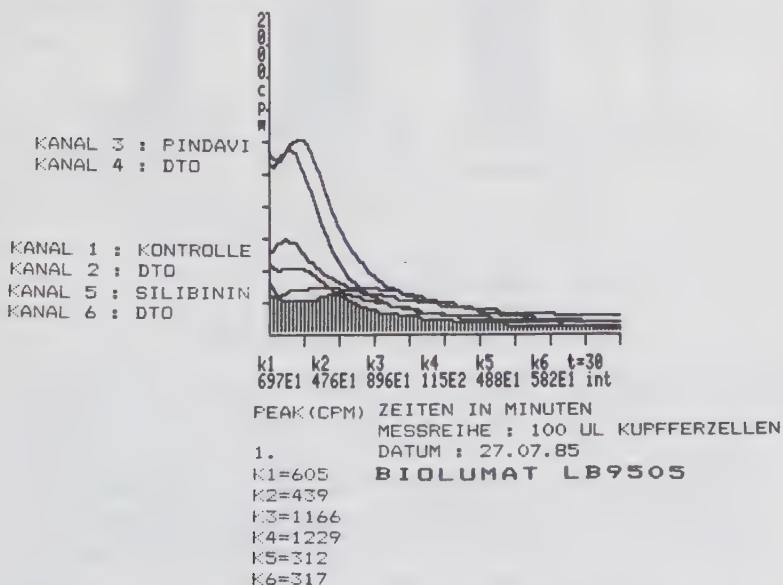


Abb. 20: Einfluß von PIND-AVI und Silibinin auf die Kupfferzellfraktion ruhender Rattenlebern. Bestimmung der Chemilumineszenz nach Verstärkung mit Lucigenin. Zelldichte jeweils 10^6 Zellen je ml Versuchsansatz. Wirkstoffzusatz unmittelbar vor Start des in-vitro-Versuchs.

Unter PIND-AVI-Inkubation kam es durchschnittlich zu einer Steigerung der Biolumineszenz um 65 % ($p < 0,05$), während die Ansätze mit Silibinin praktisch unverändert blieben (Abb. 20 und 21a).

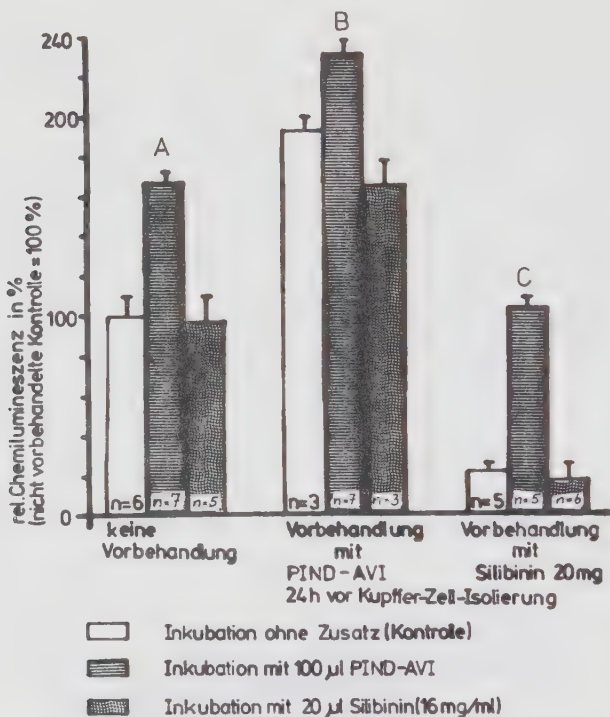


Abb. 21: Einfluß von PIND-AVI und Silibinin auf die Chemilumineszenz der Kupferzellfraktion ruhender Lebern.

A. unbehandelten Tieren wurden die ruhenden Lebern entnommen und nach Isolierung der Kupferzellen diese in vitro mit und ohne Wirkstoffe inkubiert.

B. Ratten wurden 24 h vor Kupferzellisolierung mit PIND-AVI i.p. behandelt. Die Zellen wurden dann mit und ohne Wirkstoffe inkubiert.

C. Ratten wurden 24 h vor Kupferzellisolierung mit Silibinin i.p. behandelt. Die Zellen wurden dann mit und ohne Wirkstoffe inkubiert.

4.4.2. Einfluß von in-vivo-Vorstimulierung mit PIND-AVI auf die Chemilumineszenz von Kupfferzellen

24 Stunden vor Kupfferzell-Isolierung wurde den Tieren jeweils eine Dosis PIND-AVI intraperitoneal appliziert; als Kontrolltiere dienten Ratten, denen stattdessen 1 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. verabreicht wurde. Die in-vitro-Inkubationen wurden wie bei 4.4.1. beschrieben ausgeführt. Parallel wurden jeweils folgende Ansätze geprüft:

1. Kupfferzellen ohne Vorstimulierung ohne Wirkstoffe (Kontrolle)
 2. Kupfferzellen ohne Vorstimulierung mit 100 µl PIND-AVI
 3. Kupfferzellen ohne Vorstimulierung mit 20 µl Silibinin
 4. Kupfferzellen mit Vorstimulierung ohne Wirkstoffe
 5. Kupfferzellen mit Vorstimulierung mit 100 µl PIND-AVI
 6. Kupfferzellen mit Vorstimulierung mit 20 µl Silibinin
- Der Gehalt der Silibininlösung betrug jeweils 16 mg/ml.

Dabei wurde folgendes festgestellt:

Stimulierung mit PIND-AVI 24 h vor Kupfferzellisolierung steigert die Biolumineszenzaktivität der Lebermakrophagen um etwa 100 % über den Kontrollwert ($p < 0,05$). Werden vorstimulierte Kupfferzellen mit PIND-AVI inkubiert, so nimmt die Biolumineszenz nochmals zu. Sie erreicht knapp 150 % des Kontrollwertes ($p < 0,05$). Silibininlösung im Inkubationsansatz reduziert die Chemilumineszenz der vorstimulierten Kupfferzellen. Abbildung 21 b zeigt die quantitativen Unterschiede durch die verschiedenen Einflüsse auf die vorstimulierten Zellen.

4.4.3. Einfluß von in-vivo-Vorbehandlung mit Silibinin auf die Chemilumineszenz von Kupfferzellen

In Analogie zu dem in 4.4.2. beschriebenen Versuchsaufbau wurden Ratten mit 20 mg Silibinindihemisuccinat 24 h vor Isolierung der Kupfferzellen behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 c dargestellt.

Kupfferzellen von Tieren, die Silibinin 24 vor Zellisolierung erhielten, zeigten bei der in-vitro-Inkubation praktisch keine

Biolumineszenz mehr. Sie betrug nur noch 25 % des Kontrollwertes bei nicht vorbehandelten Tieren. Setzte man der Inkubationslösung 100 μ l PIND-AVI zu, so wurde der Kontrollwert von 100-%iger Biolumineszenz wieder erreicht. Silibinin im in-vitro-Ansatz beeinflusste die Biolumineszenz praktisch nicht: Auch hier lagen die gemessenen Werte für die Biolumineszenz bei etwa 20 % der unbehandelten Kontrolle.

4.4.4. Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit der Biolumineszenz nach in-vitro-Aktivierung mit PIND-AVI

Dem Inkubationsgemisch wurden zwischen 0 und 200 μ l PIND-AVI-Lösung zugesetzt, ehe Kupfferzellen zupipettiert wurden. Abbildung 22 zeigt die Entwicklung der Biolumineszenz in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge PIND-AVI.

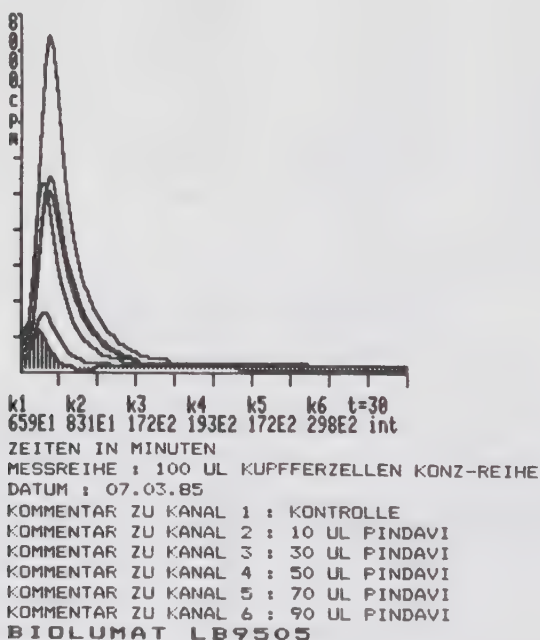


Abb. 22: Konzentrationsabhängigkeit der Chemilumineszenz von aktivierten Kupferzellen aus ruhenden Lebern nach Zusatz von 10 bis 90 μ l PIND-AVI-Lösung zu je 10^6 Zellen.

Die gemessene Chemilumineszenz ist, wie Abbildung 23 zeigt, direkt proportional der Menge PIND-AVI, wobei der Regressionsgeraden folgende Gleichung zugrunde liegt:

$$Y = 113,18 + 3,51 x$$

Der Regressionskoeffizient beträgt dabei 0,946.

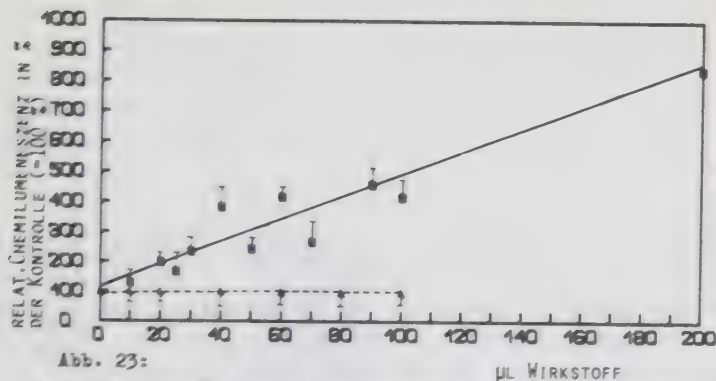


Abb. 23: Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen ausgelöster Biolumineszenz und in-vitro verabreichter Menge PIND-AVI (■) bzw. Silibinin (Δ) bei Kupfferschen Sternzellen. $n = 5$. Angegebene Werte $\bar{x} \pm S.D.$ PIND-AVI-Konzentration: 1 Dosisierungseinheit in 1 ml sterilem Wasser; Silibinin-Konzentration: 16 mg/ml PBS-Pufferlösung.

4.4.5. Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit der Biolumineszenz bei in-vitro-Aktivierung mit Silibinin

Dem Inkubationsgemisch wurde Silibinindihemisuccinatlösung (16 mg/ml) in Volumina zwischen 0 und 100 µl zugesetzt, ehe Kupferzellen zupipettiert wurden. Wie Abbildung 23 veranschaulicht, besteht bei Silibinin praktisch keine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit bei der Intensität der Chemilumineszenz. Dieses Ergebnis korreliert auch gut mit den in den Abschnitten 4.1. bis 4.3. beschriebenen. Die Regressionsgerade für die Dosis-Wirkungs-Beziehung wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$Y = 91,4 + 0,04 x$$

Der Regressionskoeffizient beträgt 0,918.

4.4.6. Einfluß verschiedener spezifischer Hemmstoffe für aktive Sauerstoffspezies auf die Biolumineszenz von Kupfferzellen

Wie Abbildung 19 erläutert, liefert die immunkompetente Zelle nach Aktivierung vier aktive Sauerstoffspezies, nämlich das $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikal, Wasserstoffperoxid, das $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikal und Singulett-Sauerstoff. Die Bildung aktivierter Sauerstoffspezies ist spezifisch hemmbar, nämlich

- das $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikal durch den Polyalkohol Mannit
- Wasserstoffperoxid durch Katalase
- das $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikal durch Superoxiddismutase (SOD)
- Singulett-Sauerstoff durch die stark lipophile Vitamin-A-Säure

Um die aktive Sauerstoffspezies zu bestimmen, die bei Kupfferzellen überwiegend für die Biolumineszenz verantwortlich ist, wurden Versuche mit Mannit, Katalase und SOD als Hemmstoffe durchgeführt. Auf Versuche mit Vitamin-A-Säure wurde wegen ihrer geringen Wasserlöslichkeit verzichtet. Im Versuchsansatz wäre Alkohol als Lösungsvermittler erforderlich gewesen, eine Substanz, die für Kupfferzellen stark toxisch ist (120).

Abbildung 24 zeigt die Verläufe der Biolumineszenzreaktionen unter den Einflüssen der verschiedenen Hemmstoffe.

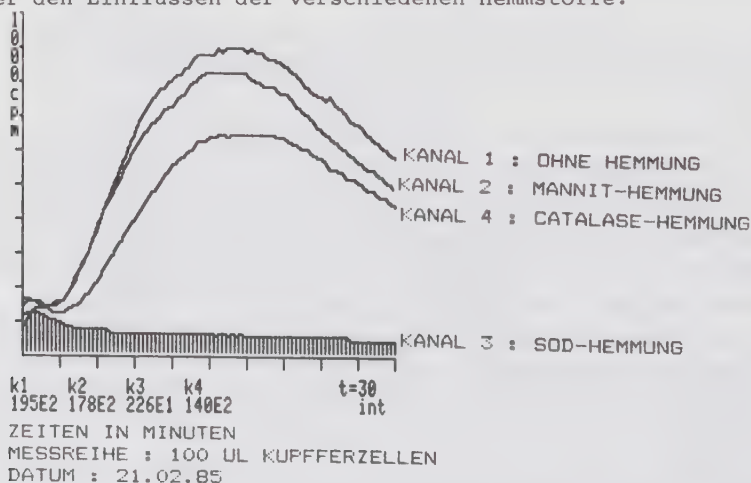


Abb. 24: Einfluß von Hemmstoffen der Bildung aktiver Sauerstoffspezies auf den Verlauf der Chemilumineszenzreaktion bei Kupfferzellen.

Abbildung 25 veranschaulicht, daß Mannitlösung (1 mg/ml) eine Chemilumineszenzverminderung um durchschnittlich 10 % bewirkt. Katalase reduziert die Photonenbildung um durchschnittlich 20 %. Die stärkste Hemmung der Biolumineszenz wird durch die SOD ausgelöst. Die durchschnittliche Zahl der Photonenereignisse geht nach SOD-Zusatz um über 90 % gegenüber Kontrolle zurück. Den Hauptanteil der durch Chemilumineszenz nachgewiesenen aktiven Sauerstoffspezies stellt demnach das $O_2^{\cdot-}$ -Radikal dar. Dieser Befund stimmt mit Literaturergebnissen bei anderen aktivierten Makrophagen, etwa des Knochenmarks, des Peritoneums oder der Lunge überein (100). Bei den Untersuchungen war es ohne Bedeutung, ob die Zellen mit PIND-AVI, Silibinin oder wirkstofffrei inkubiert wurden.

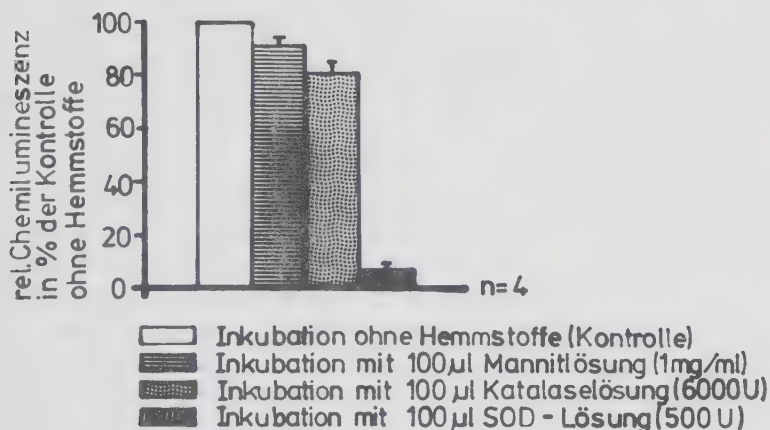


Abb. 25: Reduzierung der Chemilumineszenzreaktion aktivierter Kupfferzellen durch spezifische Hemmstoffe für die Bildung aktiver Sauerstoffspezies.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß PIND-AVI die phagozytotische Aktivität Kupfferscher Sternzellen, gemessen an ihrer Freisetzung aktiver Sauerstoffspezies, zu steigern vermag. Dabei sind die Effekte nach in-vivo-Behandlung noch deutlicher als im reinen in-vitro-Ansatz. Schließt man für Paramunitätsinducer Booster-Effekte aus (34, 35), so muß man das Ergebnis dahingehend interpretieren, daß PIND-AVI in vivo makrophagenstimulierende Faktoren (MSF) induziert, welche die Kupfferzellen zu vermehrter phagozytotischer Aktivität anregen. Dabei ist auch an eine kooperative Beteiligung von Helfer-T-Lymphozyten zu denken, die nach

PIND-AVI-Applikation vermehrt Leukotriene bzw. Interleukin-2 mit MSF-Aktivität freisetzen (117, 118, 119). In ähnlichem Zusammenhang ist auch die Chemilumineszenzminderung durch Silibinin, insbesondere nach in-vivo-Anwendung, zu sehen. Nach Vogel verhält sich die Substanz am Modell der experimentellen Peritonitis der Ratte ja keineswegs indifferent gegenüber der Arachidonsäurekaskade, hemmt sie doch signifikant die permeabilitätsbedingte Exsudatbildung im Peritoneum, was auf eine Unterbrechung der Arachidonsäurekaskade hinzuweisen scheint. Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels (Eicosanoide, PGE_2) sind nach Bonta et al. (118) aber wesentlich an der Aktivität immunkompetenter Zellen beteiligt.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

PIND-AVI, Silibinin und 16- α -PCN sind Wirkstoffe, die Einfluß nehmen auf den Thymidinstoffwechsel des Hepatozyten. Die Aktivität der Thymidinkinase ruhender Hepatozyten wird sowohl von PIND-AVI als auch von Silibinin und 16- α -PCN auf Werte gesteigert, wie sie bei regenerierenden Hepatozyten gemessen werden. Mit dem ersten Schritt bei der Bildung der Thymidinphosphate beeinflussen die Wirkstoffe die Bereitstellung energiereicher DNA-Präkursoren. Diesen Schritt kann PIND-AVI sogar bei regenerierenden Hepatozyten noch weiter optimieren. Darüberhinaus ist einzig PIND-AVI in der Lage, die für die Zellteilung nötige de-novo-Synthese der DNA zu stimulieren, so daß ein vermehrtes Angebot an DNA-Bausteinen auch zu vermehrter DNA-Bildung in der Folge führt. Dabei scheint PIND-AVI seine Wirksamkeit in Form des komplexen Stoffgemisches eines Viruslyophilisats zu entfalten, denn Untersuchungen zur Wirkung der isolierten DNA-Fraktion ergaben keine stimulierenden Effekte.

Versuche zum Einfluß von PIND-AVI auf den Thymidintransport ruhender Hepatozyten lieferten Ergebnisse, die gut mit den oben genannten korrelieren. Durch PIND-AVI nimmt die Aktivität des high-affinity-carriers des Thymidintransports deutlich ab, ein Vorgang, der typisch ist für Hepatozyten, die die G₀-Arretierung des Zellzyklus verlassen haben und in das proliferative Stadium übergegangen sind. Da parallel dazu die Substrataffinität des Carriers signifikant zunimmt, kommt es in der Konsequenz zu nur unwesentlichen Veränderungen der Gesamttransportleistung im Bereich der hepatozellulär-physiologischen Thymidinkonzentration um 1 μ mol/l.

Untersuchungen zur Entwicklung des Lebergewichts nach 2/3-Hepatektomie zeigen unter PIND-AVI das Lebergewicht bereits vom ersten postoperativen Tag deutlich erhöht gegenüber Tieren, die unbehandelt oder mit Silibinin bzw. 16- α -PCN behandelt waren. Dieses Ergebnis gibt zu denken, erwartet man doch 24 h nach Teilhepatektomie nur den Effekt des Masseverlustes. Eine mögliche Erklärung kann eine weitere Versuchsreihe liefern, die an nicht teilhepatektomierten Tieren durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich, daß PIND-AVI in der Lage ist, ab dem zweiten Tag der Appli-

kation das Lebergewicht zu steigern. Es scheint, als löse PIND-AVI proliferative Prozesse aus, die mit der Gewichtszunahme korrelieren.

Nachdem die Wirkung der meisten Stimulatoren hepatischer Aktivität auf einem hepatotoxischen Prinzip beruht (Phenobarbitalinduktion, 2/3-Hepatektomie) und damit auf der Verminderung aktiven Leberfunktionsgewebes unterhalb der "kritischen Masse", sollte die Kontrolle typischer Leberenzyme Aufschluß darüber geben, inwieweit nicht doch schädigende Einflüsse die Wirksamkeit von PIND-AVI und Silibinin bedingen.

Bei lebergesunden Tieren wurden die typischen Serumenzyme GOT (ASAT), GPT (ALAT), AP, LDH, GT, Totalbilirubin, Cholesterin und Cholinesterase untersucht. Bei keinem Enzym kam es unter PIND-AVI oder Silibinin zu signifikanten Veränderungen gegenüber unbehandelten Kontrollen, die auf toxische Schäden hinwiesen. Unter 16- α -PCN kam es zu signifikanten Steigerungen von GOT, GPT und LDH, was auf ein toxisches Geschehen im Hepatozyten schließen läßt.

Verlaufskontrollen über 4 Tage zeigten, daß bei 2/3-hepatektomierten Tieren PIND-AVI Spitzenwerte bei der Entgleisung des Enzymmusters mindert und eine raschere Rückkehr in den Normalbereich unterstützt. Silibinin kann Entgleisungen der GOT und GPT innerhalb des ersten postoperativen Tages nicht verhindern, doch bewirkt es selbst bei diesen Parametern eine raschere Normalisierung als unbehandelte Kontrollen. Mit Ausnahme der Entwicklung der GT induziert Silibinin bei den übrigen getesteten Enzymen eine raschere Normalisierung bei gemilderten Extremwerten. Die GT allerdings wird durch Silibinin massiv gesteigert, insbesondere am vierten Tag nach Teilhepatektomie. Als mögliche Ursache kann ein sich ausbildender Verschlußikterus angenommen werden.

Neben der Beeinflussung biochemischer Parameter durch Silibinin und PIND-AVI sollte deren Einfluß auf die immunkompetenten Zellen der Leber geprüft werden, um daraus mögliche Kombinationseffekte für die Behandlung hepatischer Erkrankungen ableiten zu können. Im in-vitro-Ansatz war PIND-AVI in der Lage, die Chemilumineszenz Kupfferscher Sternzellen massiv zu steigern, während Silibinin erwartungsgemäß keinen Einfluß ausübte. Wurden Tiere in vivo mit

PIND-AVI vorbehandelt, so kam es im in-vitro-Ansatz zu deutlich höherer Chemilumineszenzaktivität. Schließt man gemäß der von Mayr für Paramunitätsinducer gegebenen Definition einen Booster-Effekt auf das Immunsystem aus, so läßt sich das Ergebnis damit erklären, daß PIND-AVI im Ganztier eine Aktivierung der Helfer-T-Lymphozyten (HTL) bewirkt, welche durch Freisetzung von Makrophagen-aktivierenden Faktoren (MAF) eine Vorstimulierung der Kupfferzellen auslösen, auf der dann im in-vitro-Ansatz aufgebaut wird. Wurden Tiere dagegen in vivo mit Silibinin vorbehandelt, so ging die Chemilumineszenzaktivität des in-vitro-Ansatzes dramatisch zurück, konnte aber durch PIND-AVI-Zusatz zu den isolierten Kupfferzellen wieder auf Werte im Kontrollbereich angehoben werden. Silibinin wirkt möglicherweise hemmend auf die HTL-Fraktion von Ratten, so daß in der Folge auch die Aktivität der Lebermakrophagen gemindert wird.

Im Versuchsansatz mit isolierten Kupfferzellen konnte mit der Biolumineszenzmethode eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung bei der Verwendung von PIND-AVI als Immunmodulator registriert werden. Ein "Umkippen" der Reaktion, d.h. die Minderung der immunologischen Reaktion bei weiterer Inducerzugabe - oft typisch für Dosis-Wirkungsbeziehungen bei Immunmodulatoren, konnte im untersuchten Konzentrationsbereich nicht festgestellt werden.

Die Art der für die Biolumineszenz verantwortlichen aktiven Sauerstoffspezies konnte durch die Verwendung typischer Hemmstoffe für deren Bildung nachgewiesen werden. Dabei bestätigte sich die Ähnlichkeit der Kupfferzellen mit anderen Makrophagen, produzieren sie doch gleichfalls hauptsächlich das $O_2^{\cdot-}$ -Radikal als Ursache der Biolumineszenz nach Aktivierung. PIND-AVI nimmt nur quantitativ, nicht aber qualitativ Einfluß auf die Bildung der aktiven Sauerstoffspezies bei Kupfferzellen.

Abschließend kann man festhalten,

1. daß PIND-AVI den Thymidinstoffwechsel auf eine Weise verändert, die typisch ist für Hepatozyten, welche die G_0 -Phase verlassen haben und in den Zellzyklus eingetreten sind,
2. daß PIND-AVI als einzige untersuchte Substanz in der Lage ist, die DNA-Synthese zu steigern,

3. daß PIND-AVI in der Lage ist, binnen zwei Behandlungstagen eine Zunahme des Lebergewichts auszulösen,
4. daß PIND-AVI Entgleisungen im Enzymmuster der Leber nach Teilhepatektomie nivelliert und eine raschere Normalisierung bewirkt,
5. daß PIND-AVI die Makrophagen der Leber zur vermehrter Biolumineszenzaktivität stimuliert und
6. daß PIND-AVI untoxisch ist.

Mit dem Paramunitätsinducer kann deshalb ein neues Prinzip in der Therapie der geschädigten Leber diskutiert werden, das auf einem Synergismus biochemischer und immunologischer Veränderungen unterschiedlicher Zellpopulationen der Leber aufbaut mit dem Ziel, eine raschere Regeneration, ausgehend von intaktem Lebergewebe, zu erreichen. Die scheint möglich zu sein, weil PIND-AVI nach in-vivo-Applikation die immunkompetenten Zellen der Leber stimuliert. Diese spielen bei der Regeneration eine entscheidende Rolle durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren für die Hepatozyten. Daneben bewirkt die Makrophagenstimulation eine gesteigerte phagozytotische Aktivität, die vermehrt nekrotische Gewebsanteile eliminiert und dadurch einerseits Platz schafft für Regenerationsgewebe, andererseits durch den Abbau von Zellsubstanz Präkursoren eines neuen Zellwachstums bereitstellt. Da PIND-AVI in den Hepatozyten nicht aufgenommen wird und - wie Vorversuche ergeben haben - bei reiner in-vitro-Inkubation den Hepatozyten nicht beeinflußt, erscheint es wahrscheinlich, daß der Paramunitätsinducer seine Wirkung auf das Leberfunktionsgewebe dadurch entfaltet, daß er primär die Makrophagen stimuliert, deren freigesetzte Faktoren (Interleukin-2, Akutphasen-Protein-Stimulierender-Faktor) (121,122) dann im Hepatozyten eine Induktion der Proteinsynthese (α_2 -Makroglobulin, CAD-Komplex) (123) bewirken. Der CAD-Komplex ist ein Protein, das die Wirkungen der Carbamoylphosphat-Synthetase, der Aspartat-Transcarbamoylase und der Dihydroorotase umfaßt und damit die ersten Schritte der Pyrimidin-de-novo-Synthese, die zu den Nukleinsäurepräkursoren Cytidin, Uridin und Thymidin führen, katalysiert.

6. Material und Methoden

6.1. Material

6.1.1. Chemische Reagenzien und Biochemika

Äther zu Narkosezwecken	Hoechst, Frankfurt
Aminex AG-1 X 8, 200-400 mesh	biorad labs., München
Aminex A 27 für die HPLC	biorad labs., München
Aminosäuren-Konzentrat	Boehringer, Mannheim
Ammoniumformiat, p.a.	Fluka, CH-Buchs
Carbogen-Gasegemisch	Linde, Hohenbrunn
Collagenase (E.C.3.4.24.3)	Boehringer, Mannheim
DC-Fertigplatten	Merck, Darmstadt
Enzymtestsätze	Boehringer, Mannheim
Ethanol DAB 8	Riedel-de Haen, Seelze
Heparin (Liquemin ^R)	Hoffmann-La Roche, CH-Basel
HEPES (N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N-ethansulfonsäure)	Sigma, Taufkirchen
HPLC-Fertigsäulen 250 x 4 mm mit Aminex A 27; 13 µm	biorad labs., München und Knauer, Berlin
Kaliumdihydrogenphosphat p.a.	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Membranfilter 0,2 µm	Millipore, Eschborn
Natriumhydrogencarbonat p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nukleobasen, Nukleoside und Nukleotide	Sigma, Taufkirchen u. Boehringer, Mannheim
Pronase aus Streptomyces gris.	Boehringer, Mannheim
Szintillator Readysolv MP	Beckman Instruments, München
Fertigszintillationsgemisch	München
Methyl- ³ H-Desoxythymidin (spez. Aktivität: 2,5 x 10 ⁸ Bq)	Amersham-Buchler, Hannover
Tetrachlorkohlenstoff p.a.	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure p.a.	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethyl-aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Wasser, reinst, keimfrei (Widerstand >16 Mega-Ohm/cm)	eigene Herstellung (Milli-Q-Reinstwasseranlage, Millipore, Eschborn)

alle übrigen Chemikalien und Reagenzien sind, soweit nichts anderes angegeben, von höchstem kommerziell-erhältlichem Reinheitsgrad.

6.1.2. Physiologische Pufferlösungen und Inkubationsmedien

Inkubationsmedium nach Hanks (ohne Calcium) (105)

Das Inkubationsmedium nach Hanks wird aus einer Stammlösung bereitet, die wie folgt zusammengesetzt ist:

Natriumchlorid	71,0 g	1210 mmol/l
Magnesiumsulfat	2,0 g	8 mmol/l
Kaliumchlorid	4,0 g	54 mmol/l
Kaliumdihydrogen- phosphat	3,2 g	24 mmol/l
Wasser ad	1000 ml	

Die Stammlösung wird 1 + 9 mit sterilem Wasser verdünnt. Unmittelbar vor Gebrauch wird je Liter gebrauchsfertiger Lösung 1,5 g Natriumhydrogencarbonat (18 mmol/l) zugesetzt, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die gesamte Lösung durch 0,2 µm Membranfilter sterilfiltriert.

Inkubationsmedium nach Earle (106)

Das Inkubationsmedium nach Earle wird aus einer Stammlösung bereitet, die wie folgt zusammengesetzt ist:

Natriumchlorid	68,0 g	1162 mmol/l
Magnesiumsulfat	2,0 g	8 mmol/l
Kaliumchlorid	4,0 g	54 mmol/l
Natriumdihydrogen- phosphat	1,4 g	12 mmol/l
Calciumchlorid	2,0 g	18 mmol/l
Wasser ad	1000 ml	

Die Stammlösung wird 1 + 9 mit sterilem Wasser verdünnt. Unmittelbar vor Gebrauch werden je Liter gebrauchsfertiger Lösung 2,2 g Natriumhydrogencarbonat (26 mmol/l) zugesetzt. Die Lösung wird auf pH 7,4 eingestellt und durch 0,2 µm Membranfilter sterilfiltriert.

Lösungen für die Bestimmung der Thymidinkinase

1. Lysispuffer (107)

Kaliumchlorid	11,781 g	158 mmol/l
Mercaptoethanol	0,235 g	4 mmol/l
Tris-HCl	1,211 g	8 mmol/l
Wasser ad	1000 ml	

Unmittelbar vor Gebrauch wird die Lösung auf pH 7,4 eingestellt und durch ein 0,2 µm Membranfilter sterilfiltriert.

2. "Stammpuffer" (108)

Inkubationsmedium des zellfreien 100.000 x g Überstandes zur Bestimmung der Aktivität der Thymidinkinase. Der "Stammpuffer" ist wie folgt zusammengesetzt:

Kaliumchlorid	15,434 g	207 mmol/l
Tris-HCl	10,297 g	65 mmol/l
Magnesiumchlorid	3,456 g	15 mmol/l
Natriumfluorid	0,300 g	7 mmol/l
3-Phosphoglycerin- säure	3,150 g	17 mmol/l
Wasser ad	1000 ml	

Die Lösung wird auf pH 8,0 eingestellt und unmittelbar vor Gebrauch über 0,2 µm Membranfilter sterilfiltriert. Zum Start der enzymatischen Reaktion wird dem Puffer ATP in einer Konzentration von 10 mmol/l zugesetzt.

Trypanblaulösung

Trypanblau	150 mg
Natriumchlorid	120 mg
Wasser ad	15 ml

Die entstandene tiefblaue Lösung wird nach Bereitung durch ein Faltenfilter filtriert.

6.1.3. Laborgeräte

Niederdruck-Chromatographie

Chromatographierohr aus Glas (300 x 16 mm), Peristaltikpumpe Varioperpex 12000 und Fraktionssammler RadiRac, Fa. LKB, Gräfenfing.

Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Einkolbenpumpe Modell 410/414, Hochdruckgradientenmischer, Steuergerät Programmer 200, UV-/vis-Spektralphotometer mit 8 µl Durchflußküvette (1 cm Lichtweg), Labordatensystem Anacomp 220/4, Fa. Kontron, Eching

Integrator CR-1A

Shimadzu, Düsseldorf

Integrator CI-10

Milton-Roy, Hasselroth

Fraktionssammler Frac 100 und Peristaltikpumpe P 1, Fa. Pharmacia
Freiburg

Flüssigszintillationsmessung

Automatic Liquid Scintillation Counter MR 300, Fa. Kontron, Eching

Photometrie

Digitalphotometer 6114 S/ 1101 M, Fa. Eppendorf, Hamburg

Spektralphotometer, Fa. Carl Zeiss, Wetzlar

Spectrophotometer 150-20, Fa. Hitachi, Haar

Sonstige Laborgeräte

Ultrazentrifuge L 2

Beckman Instruments, München

Laborzentrifuge

Eppendorf, Hamburg

Schwingbecherzentrifuge

Hettich

pH-Elektroden

Ingold, Frankfurt

Halbmikro-Osmometer

Knauer, Berlin

6.1.4. Wirkstoffe

PIND-AVI

Paramunitätsinducer; aus Rinderamnionflüssigkeit lyophilisiertes Virus; standardisiert auf einen Titer von $10^{7,75}$ bis $10^{8,5}$ KID/ml mit einem Wirkungsindex von 70 bis 90 im VSV-Test (40). Dosierung und Anwendung: Jedes Tier erhielt eine Inducerdosis in 1 ml sterilem Aqua ad injectabilia intraperitoneal jeweils 24 Stunden vor dem Versuch.

16- α -Pregnenoloncarbonitril

Weißes, in Wasser und Alkohol praktisch unlösliches Pulver. Hersteller: Fa. Upjohn, Kalamazoo, Michigan, USA. Dosierung und Anwendung: Zur intraperitonealen Injektion wird das Pulver in steriler physiologischer Kochsalzlösung mittels Ultraschall suspendiert (15 mg/ml). Je 100 g Körpergewicht werden 15 mg Wirkstoff jeweils 24 Stunden vor Versuchsbeginn verabreicht.

Silibininidihemisuccinat, Natriumsalz

Wasserlösliche Form des in Legalon^R enthaltenen Flavolignans Silibinin aus *Silybum marianum* L. Gaertn. Hersteller: Fa. Madaus, Köln. Dosierung und Anwendung: 20 mg Substanz werden in 1 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung gelöst und je 100 g Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die Applikation erfolgte jeweils 24 h vor Versuchsbeginn.

Tetrachlorkohlenstoff

wurde in p.a.-Qualität von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen und in einer Dosierung von 0,5 ml intraperitoneal 24 Stunden vor Versuchsbeginn verabreicht.

6.1.5. Tiermaterial

Die Untersuchungen wurden an ca. 300 g schweren, etwa 4 Monate alten männlichen Wistarratten aus eigener konventioneller Zucht durchgeführt. Die Tiere hatten einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten Wasser und pelletierte Nagerdiät (Altromin bzw. Alma Ratten und Mäuse Haltingsdiät) ad libitum.

6.2. Methoden

Alle Versuche wurden zur gleichen Tageszeit, zwischen 8 und 9 Uhr vormittags begonnen, um zirkadiane Schwankungen zu minimieren.

6.2.1. Isolierung von Leberparenchymzellen

Die Methode zur Gewinnung isolierter Hepatozyten lehnt sich im wesentlichen an das von Baur (109) entwickelte Verfahren an. Von Ungemach (11) wurden dabei in wichtigen Punkten Verbesserungen angebracht, die zu einer vermehrten Ausbeute intakter Zellen führten. Der Eingriff am Tier zur Entnahme der Leber wurde stets zwischen 9 und 10 Uhr morgens unter Äthernarkose ausgeführt. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden 30 I.E. Heparin in die hintere Hohlvene gespritzt, die Pfortader kanüliert und die Leber via hintere Hohlvene mit 50 ml Perfusionsmedium entblutet. Als Perfusionsmedium diente Calcium- und Glucose-freier Hanks-Puffer, der mit Carbogen gesättigt war. Nach Eröffnung des Thorax wurde die Hohlvene knapp kaudal des Herzens in gleicher Weise kanüliert und die Leber aus dem umliegenden Gewebe entfernt. Bis zum Anschluß des isolierten Organs an eine Perfusionsapparatur nach Miller (110) war die Sauerstoffversorgung für weniger als eine Minute unterbrochen. Die Perfusion erfolgte in porto-cavaler Richtung bei 37 °C und pH 7,4 im offenen System. Zur Deckung des O₂-Bedarfs der Leber betrug die Durchflußrate in Anlehnung an Sugano und Mitarbeiter (111) etwa 50 bis 60 ml/min. Der Perfusionsdruck betrug ca. 15 cm Wassersäule, der Staudruck der Leber durfte 7 cm Wassersäule nicht überschreiten. Nach Durchfluß von etwa 100 ml Medium war die Leber zuverlässig blutfrei und es wurde mit 70 ml Medium im geschlossenen System weiterperfundiert. Diesem Perfusionsmedium war Collagenase in einer Konzentration von 60 Einheiten nach Mandl (112) je Milliliter zugesetzt. Auf eine gleichzeitige Zugabe von Hyaluronidase wurde gemäß einer Empfehlung von Ingbretsen (113) verzichtet. Nach etwa 20-minütiger rezirkulierender Perfusion war die Leber deutlich vergrößert, weich und brüchig. Jetzt wurde die Leberkapsel aufgeschnitten und das Gewebe in das enzymhaltige Perfusionsmedium ausgestrichen. Diese Suspension wurde nun bei 37 °C unter Carbogenbegasung von Hand kreisförmig in einem 500 ml Rundkolben über fünf Minuten geschwenkt. Anschließend wurde durch eine Doppellage Gaze koliert

und die Suspension gleichmäßig auf vier Zentrifugengläser verteilt. Nach vier Minuten Zentrifugation mit $20 \times g$ bei 4°C wurde der Überstand dekantiert und das verbliebene Zellsediment unter gleichen Zentrifugationsbedingungen zweimal mit einer Salzlösung nach Earle gewaschen. Zum Schluß wurde das Zellpellet so in Earles Medium resuspendiert, daß die Zellen in einer Dichte von 5 bis 8×10^6 Zellen je Milliliter vorlagen. Für Perfusion, Zellpräparation und Inkubation wurden stets frisch hergestellte, sterilfiltrierte Lösungen verwendet.

Für Versuche mußten die isolierten Hepatozyten folgende Kriterien erfüllen:

1. weniger als 10 % (bei regenerierenden Lebern: weniger als 15 %) der Zellen mit 0,2 %-iger Trypanblaulösung anfärbbar.
2. Spontanatmung der Zellen höher als $2,5 \mu\text{mol}$ Sauerstoff je Minute und Gramm Naßgewicht der Zellen.
3. Steigerung der Spontanatmung durch eine Succinatkonzentration von 1 mol/l um weniger als 15 % des Ausgangswertes.

6.2.2. Isolierung Kupfferscher Sternzellen

Die Isolierung der Kupfferschen Sternzellen erfolgte in Anlehnung an die von Pace und Garvey (114) beschriebene Methode, wobei bei der Entnahme des Organs und den Isolierungsbedingungen wesentliche Verbesserungen angebracht wurden, die zu höherer Ausbeute und Reinheit vitaler und aktiver Zellen führten. Die Leber wird dazu aus dem Tierkörper entnommen wie unter Hepatozytenisolierung beschrieben. Nachdem das Organ in einer Perfusionsapparatur nach Miller (110) mit Calcium- und Glucose-freiem Hanks Puffer blutfrei perfundiert worden war, wurde im geschlossenen System die Leber unter Zusatz von 50 mg Pronase und 14 mg Collagenase mit Hanks Medium perfundiert. Nach etwa zwanzig Minuten war die Leber weich und brüchig; die Leberkapsel wurde aufgeschnitten und das Gewebe in das enzymhaltige Medium ausgedrückt. Die Suspension wurde in einem 500 ml Kolben weitere zehn Minuten mit der Hand bei 37°C unter Carbogenbegasung im Wasserbad schonend geschwenkt. Daran schloß sich eine Filtration durch doppelagige Gaze an, ehe die Zellsuspension gleichmäßig auf 4 Zentrifugengläser verteilt wurde. Die Suspension wurde für fünf Minuten bei

300 x g und 4 °C zentrifugiert, anschließend der Überstand vom Sediment dekantiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in enzymfreiem Hanks Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt.

Zur Reinigung und Anreicherung der Makrophagen wurde an den Isolierungsschritt eine Gradientenzentrifugation mit Percoll (Fa. Pharmacia, Freiburg) angeschlossen. Dazu wurden 22 ml Percoll mit 11 ml dreifach-konzentriertem Hanks Puffer überschichtet und in der Ultrazentrifuge bei 30.000 x g über eine Stunde ein Dichtegradient eingestellt. Nach dem letzten Waschen wurde das Zellpellet in drei Millilitern Hanks Medium resuspendiert und vorsichtig auf den Percollgradienten gegossen. Daran schloß sich für 45 min eine Zentrifugation bei 800 x g und 4 °C an. Dabei bildeten sich zwei Banden aus, die sich mikroskopisch durch die Peroxidase-reaktion unterscheiden ließen: Die Bande mit der geringeren Dichte ($d = 1,04-1,06$ g/ml) enthielt die vitalen kernhaltigen Zellen, während die Bande mit höherer Dichte ($d = 1,09-1,11$ g/ml) Zellbruchstücke und verklumpte Reste von Erythrozyten enthielt. Die vitalen Zellen wurden erneut in ein Zentrifugenglas überführt, durch mehrmaliges Aufnehmen in kaltem Hanks Puffer und Zentrifugation bei 700 x g für fünf Minuten insgesamt dreimal gewaschen und schließlich auf eine Zelldichte von 10^7 Zellen je Milliliter eingestellt.

Die Vitalität der Zellen wurde durch Trypanblau-Ausschluß und den Lactat-Pyruvat-Quotienten ermittelt, die Identität durch die Peroxidase-Reaktion (s. 6.2.6.) und mikroskopische Größenbestimmung festgestellt.

Von den sinusoidalen Zellen sind nur Kupfferzellen durch ihren Gehalt an Peroxidase zur sog. Peroxidase-Reaktion befähigt (115). Sie zeigen nach Page (114) im Lichtmikroskop deutliche dunkelbraune Granula in einem hellen, klaren Zytoplasma. Nichtparenchymatöse Zellen werden nicht angefärbt. Allein restliche Erythrozyten sind einheitlich dunkelbraun gefärbt. Eventuelle Parenchymzellen sind deutlich größer (Hepatozyten um 20 bis 25 μm gegenüber Kupfferzellen um 10 bis 12 μm) und zeigen allgemein eine einheitliche, schwach hellbraune Färbung, wie die sie umgebende Reaktionslösung.

6.2.3. Die 2/3-Hepatektomie der Leber

Die 2/3-Hepatektomie erfolgte im wesentlichen nach der von Higgins und Anderson (116) beschriebenen Methode. In Äthernarkose wurden die Tiere entlang der Linea alba abdominell eröffnet. Anatomisch gesehen bildet der mittlere Leberlappen mit seinen zentral gelegenen Hälften zusammen mit dem kleinen seitlichen Lappen eine Einheit, die sich besonders für eine chirurgische Entfernung eignet. Der große mittlere und der kleine seitliche Lappen der Leber wurden deshalb durch eine Ligatur von der Blutzufuhr des Restorgans abgetrennt und nach Unterbindung der Gefäße am Leberhilus herausgeschnitten. Auf diese Weise wurden knapp 70 % der gesamten Leber entfernt; innerhalb des Bauchraumes blieben der rechte seitliche und der kleine kaudale Lappen zurück. Der Verschluss des Abdomens erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurde in fortlaufender Nahttechnik das Peritoneum gemeinsam mit der Bauchdecke verschlossen. In einer zweiten Naht wurde mittels U-Nahttechnik das Integument wiederhergestellt. Als Nahtmaterialien dienten Catgut und Supramid der Fa. Braun, Melsungen. Die Wunde wurde abschließend mit Wundverband bedeckt, um ein Aufbeißen der Nähte zu verhindern. Postoperative Komplikationen lagen unter fünf Prozent. Als therapeutische Maßnahmen erhielten die Tiere lediglich Sauerstoffanreicherung ihrer Atemluft mit Carbogen, eine körperwarme Umgebungstemperatur (37 °C) und 20 %-ige Glucoselösung anstelle des normalen Futters während der ersten 24 Stunden nach Operation. Anschließend erhielten die Tiere wieder normales Futter ad libitum.

6.2.4. Anfärbbarkeit der Zellen mit Trypanblau

10 µl der Zellsuspension (Zelldichte $6 - 8 \times 10^6$ Zellen je Milliliter) wurden mit 80 µl Earles Medium und 10 µl Trypanblaulösung kurz gemischt. Sofort anschließend wurde in einer Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal im Lichtmikroskop bei 150-facher Vergrößerung der Prozentsatz gefärbter Zellen von mindestens 300 ausgezählten Zellen ermittelt.

6.2.5. Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs

Die zelluläre Respiration wurde polarographisch mit einer Sauerstoffelektrode nach Clark und einem Sauerstoffmonitor der Fa. Eschweiler gemessen.

6.2.6. Peroxidase-Reaktion

Zur Identifizierung der Kupfferzellen wurde die Peroxidasereaktion in Anlehnung an (62) durchgeführt. Dazu werden 0,7 g Saccharose, 2,5 ml Trispuffer (0,2 mol/l), 0,4 ml Salzsäure (1 mol/l), 70 µl Wasserstoffperoxidlösung (3 %) und 10 mg Diaminobenzidin stets frisch vor Versuchsansatz gemischt und mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Ein Milliliter dieses Reagenzes wird zu einem Aliquot (etwa 10^6 Zellen) des aus der Percoll-Gradientenzentrifugation erhaltenen Pellets gegeben und nach Resuspension bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Nur Kupfferzellen zeigen eine dunkelbraune Granulierung in einem klaren Zytoplasma.

6.2.7. Messung der Thymidinaufnahme

Die Inkubation zur Bestimmung der Aufnahme extrazellulär angebotenen Thymidins wurde stets in Earles Medium durchgeführt. Die Aufnahme von Thymidin wurde bei 37 °C bestimmt. Ein Stopp des Prozesses erfolgte durch Verdünnen der Zellsuspension mit eiskalter Pufferlösung. Durch Zentrifugation über 5 sec. bei 10.000 x g und zweimaliger Waschung wurde extrazelluläres Thymidin praktisch restlos entfernt. Anschließend wurden Proteine und Nukleinsäuren mit 10-%iger eiskalter Trichloressigsäurelösung denaturiert und ausgefällt. Zur Bestimmung der Thymidinaufnahme wurden die Zellen mit ^3H -Thymidin in Konzentrationen von 0,4 bis 1300 µmol/l inkubiert. Die jeweiligen Mengen an radioaktivem Thymidin wurden mit einem Flüssigkeitsszintillator nach Quenchkorrektur über das Kanalverhältnis eines externen Standards bestimmt. Intrazellulär gemessenes Thymidin wurde auf die Zellzahl bezogen, indem für jede Probe der Nukleinsäuregehalt des Trichloressigsäurehydrolyсата durch photometrische Quantifizierung bei 260 nm bestimmt und als Parameter der Zellzahl verwendet wurde. Die Kinetik der initialen Aufnahme wurde nach Inkubationsdauer von 30 sec. gemessen.

6.2.8. Bestimmung des Phosphorylierungsmusters

Zellen wurden entsprechend den Bedingungen bei der Messung des Thymidintransports über 60 min. mit 5 $\mu\text{mol/l}$ tritiiertem Thymidin inkubiert. Die Phosphorylierungsreaktionen wurden durch Waschen mit eiskaltem Puffer nach Earle gestoppt. Die Hepatozyten wurden für 5 sec. bei 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. ^3H -Thymidinreste wurden durch zweimaliges Waschen unter gleichen Zentrifugationsbedingungen entfernt. Die Zellen wurden mit eiskalter Trichloressigsäure gefällt, am Ultraschall-Mikrotip vollständig aufgeschlossen und durch Zentrifugation bei 10.000 x g über 4 min. vom klaren, säurelöslichen Überstand abgetrennt. Dieser Überstand wurde direkt der HPLC-Analyse unterzogen. Da es sich um radioaktivmarkierte Substanzen in nur geringen Mengen handelte, trat an die Stelle der UV-photometrischen Peakdetektion die flüssigszintillatorische Bestimmung. Dazu wurde das Eluat der HPLC in Fraktionen gesammelt, mit Flüssigszintillationscocktail gemischt und nach Quenchkorrektur gemessen.

6.2.9. Bestimmung der ^3H -Thymidin-Inkorporation in die DNA

In Konzentrationsreihen von 0,4 bis 5 $\mu\text{mol/l}$ tritiiertem Thymidin wurden vitale Hepatozyten über 5 min. und 1 h mit dem Nukleosid inkubiert. Das Inkubationsexperiment wurde wie oben beschrieben mit eiskalter Pufferlösung gestoppt und die Zellen von extrazellulärem Thymidin durch zweimaliges Waschen mit Zentrifugationsschritten gereinigt. Nach Enteiweißung und Fällung der Nukleinsäuren mit eiskalter 10-%iger Trichloressigsäure wurden die Zellen am Ultraschall-Mikrotip aufgeschlossen, in 6-%iger Trichloressigsäure resuspendiert und durch vierminütige Zentrifugation bei 10.000 x g vom Überstand abgetrennt. Dieser enthielt neben anderen säurelöslichen Zellbestandteilen vor allem noch nicht inkorporierte Thymidinstoffwechselprodukte und wurde verworfen. Insgesamt wurden die devitalisierten Zellen zweimal auf diese Weise gewaschen. Das letzte Sediment wurde erneut in 10-%iger Trichloressigsäure resuspendiert und bei 70 °C im Wasserbad hydrolysiert. Stopp der Hydrolyse erfolgte durch rasches Einfrieren auf -25 °C. Nach dem Auftauen wurde abzentrifugiert und der klare Überstand, der die hydrolytisch gespaltene DNA enthielt, flüssigszintillatorisch gemessen.

6.2.10. Messung der Thymidinkinase-Aktivität

Die isolierten Hepatozyten wurden gewogen und je Gramm Naßgewicht in 1,5 ml Lysispuffer suspendiert. Durch 20-minütiges Schütteln in dem stark hypotonen Puffer wurden die Zellen aufgeschlossen. Der Puffer enthielt Mercaptoethanol zum Schutz zellulärer SH-Gruppen. Nach der hypotonen Lyse wurde die Suspension über 1 h bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert; der dabei erhaltene klare Überstand war die Enzymlösung. Diese wurde mit einem Stammpuffer, dem unmittelbar vor Versuchsbeginn 10 mmol/l ATP zugesetzt worden waren sowie der radioaktiv markierten Thymidinlösung (Endkonzentration Thymidin 0,5 bis 300 µmol/l) innig vermischt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Kinasereaktion wurde durch 3-minütiges Kochen gestoppt, das gefällte Protein durch 4-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g abgetrennt. Die erhaltene klare Lösung wurde direkt der HPLC-Auftrennung unterzogen, das Eluat der Säule in Fraktionen gesammelt und die Radioaktivität flüssigszintillatorisch quantifiziert.

6.2.11. Bestimmung der Serumaktivität von typischen Leberenzymen

Zur klinischen Verlaufskontrolle der Wirksamkeit der untersuchten Präparate sowohl auf die gesunde als auch auf die durch 2/3-Hepatektomie vorgeschädigte Leber diente die Überwachung der sog. Leberwerte im Serum. Von den Tieren wurden im Abstand von 24, 48 und 96 Stunden nach dem Versuch und der letzten Pharmakon-Applikation Blutproben mittels Monovetten^R (Fa. Sarstedt, Nürnbrecht) entnommen. Serumgewinnung erfolgte durch zehnminütige Zentrifugation bei 3000 min⁻¹. Die Enzymbestimmungen konnten dankenswerterweise im klinischen Labor der Medizinischen Tierklinik (Vorstand: Prof. Dr. W. Kraft) an einem Hitachi-Autoanalyzer durchgeführt werden. Als Parameter für die Verlaufskontrolle galten folgende Enzyme: LDH, GOT, GPT, Gamma-GT, AP, CHE, G1DH, Cholesterin und Totalbilirubin.

6.2.12. Hochdruckflüssigchromatographische Bestimmung der Thymidinmetaboliten

Die Metaboliten des Thymidins: Thymin, Thymidinmonophosphat, Thymidindiphosphat, Thymidintriphosphat und β -Aminoisobuttersäure wurden mittels HPLC aufgetrennt. Als Verfahren wurde eine selbst entwickelte Methode gewählt. Die Trennung erfolgte an dem stark basischen Anionenaustauscher Aminex A 27, einer Polystyrolmatrix mit quartären Ammoniumkationen und Formiat als Gegenion. Die Teilchengröße der Matrix betrug 13 μm und ihr Vernetzungsgrad 8 %. Als Elutionsmittel dient ein exponentiell ansteigender Gradient aus Wasser und Ammoniumformiatpuffer (pH 3,5; 1,0 mol/l) bis zu einer Endkonzentration von 75 % Puffer. Die Fließgeschwindigkeit des Eluenten betrug 1 ml/min. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 1 oder 2 ml aufgefangen, mit 3 ml Szintillationscocktail versetzt und im Flüssigszintillationszähler gemessen. Quenchkorrektur erfolgte nach der Methode des "external standard ratio".

6.2.13. In-vitro-Bestimmung der Biolumineszenz aktivierter Kupferscher Sternzellen (Chemilumineszenz aktivierter Makrophagen).

Für die in-vitro-Bestimmung der Biolumineszenz aktivierter Makrophagen sind folgende Lösungen nötig:

1. Phosphate-Buffered-Saline-Lösung (PBS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , steril, gebrauchsfertig bezogen von der Fa. Biochrom, Berlin.
2. Veronal-gepufferte Kochsalzlösung
 - a. Stammlösung:
 - 8,3 g Natriumchlorid
 - 1,02 g Diethylbarbitursäure, Na-Salz, (Veronal)
 - 0,102g Magnesiumchlorid
 - 0,022g Calciumchlorid
 - 3,5 ml Salzsäure (1 mol/l)
 - bidestilliertes Wasser ad 200 ml

b. Gebrauchsfertige Lösung: 40 ml Stammlösung werden mit 140 ml bidestilliertem Wasser verdünnt, mit Salzsäure (1 mol/l) auf pH 7.0 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt. Zu dieser Lösung werden 200 mg Rinderserumalbumin (Fa. Boehringer) und 200 mg Glucose gegeben.

3. Lucigenin-Lösung (1 mmol/l)

Zur Herstellung einer 5 millimolaren Stammlösung werden 25,5 mg Lucigenin (bis-N-Methylacridiniumnitrat) in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wird die Stammlösung 1 + 4 mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

4. Lösung von opsoniertem Zymosan

25 mg Zymosan in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung werden für 30 min. im Wasserbad bei 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung in 2-ml-Portionen eingefroren.

Zur Herstellung gebrauchsfertiger Lösung werden 2 ml Zymosanlösung mit 2 ml Serum bei Raumtemperatur für 30 min. inkubiert, zentrifugiert, mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zuletzt mit 2 ml 0,9 %-iger NaCl-Lösung versetzt.

5. Mannit-Lösung (1 mmol/l)

19 mg D-Mannit werden in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

6. Katalase (E.C.1.11.1.6) wurde als Kristallsuspension in Wasser von der Fa. Boehringer bezogen. Die Aktivität betrug 65.000 U/mg Protein. 50 µl Suspension, entsprechend 1 mg Protein, wurden mit 450 µl PBS verdünnt.

7. SOD (E.C.1.15.1.1) wurde als Lyophilisat von der Fa. Boehringer bezogen. Die Aktivität betrug 5000 U/mg Protein. 1 mg Lyophilisat wurde in 1 ml PBS gelöst.

Die Messungen wurden im Biolumat LB 9505 der Fa. Prof. Berthold, Wildbad, durchgeführt. In Kunststoff-Einmalküvetten wurde folgendes Testgemisch pipettiert:

- 560 μ l Veronalpuffer
- 200 μ l PBS-Lösung
- 100 μ l Lucigeninlösung
- 40 μ l opsonierte Zymosanlösung

Wurden Wirk- oder Hemmstoffe getestet, so wurde deren Volumen bei der Menge PBS-Lösung entsprechend berücksichtigt. Die gründlich am Vortex-Mischer durchgemischte Lösung wurde in den bei 37°C temperierten Biolumat zur Vorinkubation gestellt. In einem Wasserbad bei 37°C wurden die Kupfferzellen isotherm gehalten. Unmittelbar vor Beginn des Versuches wurden 100 μ l Sternzellsuspension, entsprechend 10^6 Zellen, in die Reagenzienlösung pipettiert, rasch durchmischt und die Meßreihe sofort gestartet. Die Chemilumineszenz wurde über 30 oder 60 min. beobachtet. Mit dem Biolumat LB 9505 konnten bis zu 6 Messungen parallel durchgeführt werden. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte an einem Apple-IIc-Computer, der Ausdruck der Grafik an einem Epson X 800 Printer-Plotter.

7. Berechnungen

7.1. Enzym- und Transportkinetik

Da in nichtregenerierenden Hepatozyten gleichzeitig zwei Transportsysteme für Thymidin vorkommen, erfolgte die rechnerische Unterscheidung beider Transportmechanismen nach der von Hegner und Ungemach beschriebenen Methode (56). Der Berechnung liegen folgende Voraussetzungen zugrunde:

1. Die Thymidinaufnahme folgt konzentrationsabhängig bei beiden Systemen einer Michaelis-Menten-Kinetik.
2. Das Vorhandensein eines hochaffinen ($K_T = 9,0 \mu\text{mol/l}$) und eines niederaffinen ($K_T = 915,6 \mu\text{mol/l}$) Carriers führt bei niederen Thymidinkonzentrationen zu einem biphasischen Aufnahme-prozeß. Dabei geht die initiale hyperbole Phase (dT-

Konz. < 6 $\mu\text{mol/l}$) in einen linearen Verlauf über.

Nimmt man an, daß in diesem Konzentrationsbereich das hochaffine Transportsystem einer Michaelis-Menten-Kinetik und das niederaffine einer Kinetik nullter Ordnung folgt, so läßt sich die Gesamtaufnahme im Konzentrationsbereich unter 20 $\mu\text{mol/l}$ durch folgende Gleichung beschreiben (11):

$$V = \frac{V_T \cdot [S]}{[S] + K_T} + k \cdot [S]$$

V: initiale Aufnahme rate in

$$\frac{\mu\text{mol dT}}{10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{min}}$$

S : Thymidinkonzentration in $\mu\text{mol/l}$

V : maximale Aufnahme rate

K : Transportkonstante, entsprechend der Michaelis-Konstanten des im Konzentrationsbereich von 4 bis 6 $\mu\text{mol/l}$ sättigbaren hochaffinen Transportsystems

k: Proportionalitätskonstante in s^{-1} der linearen Phase des niederaffinen Transportsystems. Sie entspricht der Steigung.

Durch Subtraktion des Produktes $k \cdot [S]$ von der gemessenen Gesamtaufnahme läßt sich für jede Substratkonzentration die tatsächliche Aufnahme durch den hochaffinen Carrier errechnen.

3. Die Aufnahme rate durch das niederaffine Transportsystem entspricht der Differenz zwischen Gesamtaufnahme und der aus der Michaelis-Menten-Gleichung bei der entsprechenden Substratkonzentration für das hochaffine System errechneten Aufnahme rate bzw. über 100 $\mu\text{mol/l}$ der Differenz zwischen Gesamtaufnahme und maximaler Geschwindigkeit des hochaffinen Carriers.

7.1.1. Kinetische Konstanten für Transport- und Enzymsysteme

Die kinetischen Konstanten (K_T für Transport- und K_M für Enzymsysteme) sowie die Maximalgeschwindigkeiten (V_T und V_M) wurden jeweils aus der Steigung verschiedener linearisierter Darstellungen der Michaelis-Menten-Gleichung (nach Lineweaver-Burk, Hoffstee und Eadie-Hoffstee) durch Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Quadrate errechnet. Bei der Auftragung des Quotienten $[S]/v$ gegen $[S]$ resultiert eine Gerade, deren Steigung dem reziproken Wert von V_T oder V_M entspricht. Im Diagramm v gegen $v/[S]$ stellt die negative Steigung den Zahlenwert der Michaelis-Konstanten dar.

7.2. Statistische Analyse

Aus den Einzelwerten wurde das arithmetische Mittel mit seinem Standardfehler (SEM = standard error of the mean) berechnet. Zur Prüfung der Unterschiedlichkeit zweier verschiedener unabhängiger Meßreihen diente der t-Test. Als signifikant galten Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ ($p < 0,05$).

8. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. WAGNER,H., HÖRHAMMER,L., MÜNSTER,R.: *Arzneim. Forsch.* **18**, 688 (1968)
2. SONNENBICHLER,J., MATTERSBERGER,J. und HAUSER,G.: *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **361**, 1751-1756 (1980)
3. SONNENBICHLER,J. und POHL,A.: *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **361**, 1757-1761 (1980)
4. VOGEL,G., TROST,W., BRAATZ,R., ODENTHAL,K.P., BRÜSEWITZ,G., ANTWEILER,H., SEEGER,R.: *Arzneim. Forsch.* **25**, 82 (1975)
5. WAGNER,H.: *Pharmazeutische Biologie. 2.: Drogen und ihre Inhaltsstoffe.* 2./1982. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York
6. MAYR,A., STICKL,H., GILLESBERGER,W., SCHWAN,D. und BIBRACK,B.: *Fortschr. Med.* **95**, 87-93 (1977)
7. McINTYRE,N. und MORGAN,M.Y. in: WRIGHT,R., ALBERTI,K.G.M.M., KARRAN,S. und MILLWARD-SADLER,G.H. (Ed.): *Liver and Biliary Disease.* 1979 W.B. Saunders Company Ltd., London, Philadelphia, Toronto. pp.108
8. McINTYRE,N. und MORGAN,M.Y.: a.a.O. p.110
9. SIMPSON,G.E. und FINCKH,E.S.: *J. Path. Bact.* **86**, 361-370 (1963)
10. BOLLMANN,J.L. in: SCHIFF,L. (Ed): *Diseases of the Liver.* 1956 Pitman Med. Public. London. pp.47-55
11. UNGEMACH,F.R.: *Untersuchungen über die Schädigung der Plasmamembran von Hepatozyten nach Lipidperoxidation.* Habilitationsschrift med. vet. Univ. München 1982. S.67
12. UNGEMACH,F.R., JORDAN,W., ALTSCHUH,C.P., PETTER,A. und HEGNER,D.(+): *Forsch.Ber.Wehrmed* 1984, BMVg Bonn, S.5 ff
13. GIBSON,J.E. und CAGEN,S.Z. in: AUTOR,A.P. (Ed.): *Biochemical Mechanisms of Paraquat Toxicity.* 1977 Academic Press, New York. p.117
14. TERBLANCHE,J., HICKMAN,R., MILLER,D.J. und SAUNDERS,S.J. in: WILLIAMS,R. und MURRAY-LYON,I. (Ed.): *Artificial liver support.* 1975 Pitman Med. Public. London. pp.163-172
15. TONGENDORF,J., TREBIN,R. und RUHENSTROTH-BAUER,G.: *Am. J. Path.* **80**, 519-524 (1975)
16. STOWELL,R.E.: *Arch. Path.* **46**, 164-178 (1948)
17. MURRAY,A.B., STRECKER,W. und SILZ,S.: *Hepato-Gastroenterology* **27**, 4-8 (1980)

18. BARBIROLI, B. und POTTER, V.R.: Science **172**, 738-741 (1971)
19. GRISHAM, J.W.: Cancer Res. **22**, 842-849 (1962)
20. SCHNEIDER, H.: Anreicherung eines Leberzellproliferationsfaktors aus adulten teilhepatektomierten Ratten. Dissert. med. Univ. München 1980
21. MANN, F.C.: J. Mt. Sinai Hosp. **11**, 65-74 (1944)
22. WEINBREN, K.: Br. J. Exp. Path. **36**, 583-591 (1955)
23. STARZL, T.E., FRANCAVILLA, A., HALGRIMSON, C.G., FRANCAVILLA, F.R., PORTER, K.A., BROWN, T.H. und PUTNAM, C.W.: Surg. Gynecol. Obstet. **137**, 179-199 (1973)
24. MAURER, H.R.: Dt. Apoth. Ztg. **120**, 839-844 (1980)
25. IVERSEN, O.H. in: BARSEGA, R. (Ed.): Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 5. Tissue Growth Factors. 1980 Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
26. NADAL, C.: Arch. Toxicol. Suppl. **2**, 131-142 (1979)
27. TRIGER, D.R. und WRIGHT, R. in: Liver and Biliary Disease (a.a.O.), pp. 182-196
28. SELL, S. und FAHEY, J.L.: J. Immunol. **93**, 81-87 (1967)
29. THOMAS, H.C., MacSWEEN, R.N.M. und WHITE, R.G.: Lancet, **i**, 1288-1291 (1973)
30. INCHLEY, C.J.: Clin. Exper. Immunol. **5**, 173-187 (1967)
31. CANTOR, H.M. und DUMONT, A.E.: Nature, **215**, 744-745 (1967)
32. TRIGER, D.R. und WRIGHT, R.: Immunol. **25**, 951-956 (1973)
33. SONNENBICHLER, J. und ZETL, I.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **365**, 555-566 (1984)
34. MAYR, A., RAETTIG, H., STICKL, H. und ALEXANDER, M.: Fortschr. Med. **97**, 1159-1165 (1979)
35. MAYR, A., RAETTIG, H., STICKL, H. und ALEXANDER, M.: Fortschr. Med. **97**, 1205-1210 (1979)
36. HERLYN, M.: Die medikamentelle Steigerung der Resistenz. Dissert. med. vet. Univ. München 1972
37. HÄNSEL, R.: Dt. Apoth. Ztg. **125**, 155-161 (1985)
38. BICKER, U., ZIEGLER, A.E. und MAUS, W.: Exp. Pathol. **15**, 49-62 (1979)
39. MÜCK, K.F., ROLLY, H. und BURG, K.H.: Makromol. Chem. **178**, 2773 (1977)
40. MAYR, A., STICKL, H., GILLESBERGER, W., SCHWAN, D. und BIBRACK, B.: Fortschr. Med. **95**, 87-93 (1973)
41. ZAHLTEN, R.M., ROGOFF, T.M. und STEER, C.J.: Fed. Proceed. **40**, 2460-2468 (1981)

42. ROBERFROID, M.: *Toxicol.* **18**, 177-178 (1980)
43. JACKSON, R.C., LUI, M.S., BORITZKI, T.J., MORRIS, H.P. und WEBER, G.: *Cancer Res.* **40**, 1286-1291 (1980)
44. SÖDERHÄLL, S.S., LARSSON, A. und SKOOG, K.L.: *Eur. J. Biochem.* **33**, 36-39 (1973)
45. FERDINANDUS, J.A., MORRIS, H.P., WEBER, G.: *Cancer Res.* **31**, 550-556 (1971)
46. USHER, C., REITER, H.: *Cell* **12**, 365-370 (1977)
47. PLAGEMANN, P.G.W., ERBE, J.: *J. Membrane Biol.* **25**, 381-396 (1975)
48. SKIDMORE, R., TRAMS, E.G.: *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 93-103 (1970)
49. PARISH, J.H.: *Principles and Practice of Experiments with Nucleic Acids*. 1972. Longman Group Ltd. London. pp.43-46
50. RANDERATH, K.: *Dünnschichtchromatographie*. 2.Dt.Aufl. 1965, S.237
51. HÄGELE, E., FINKE, J., LEHMANN, P. und GRÄBL, M.: *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **311**, 419-420 (1982)
52. FLORIDI, A., PALMERINI, C.A. und FINI, C.: *J. Chromatogr.* **138**, 203-212 (1977)
53. FITT, P.S., PETERKEN, P.I. und GREY, V.L.: *J. Chromatogr.* **124**, 137-140 (1976)
54. DeBRUYNE, A.: *Dissert. med. vet. in Vorbereitung*
55. SPATH, F.: *Semikonservative und unprogrammierte (reparaturbedingte) Desoxyribonukleinsäuresynthese in Thymus- und Knochenmarkszellen der Ratte unter dem Einfluß von Diäthylthiocarbamat (DDC)*. *Dissert. med. vet. Univ. München* 1985
56. UNGEMACH, F.R. und HEGNER, D.: *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **359**, 845-856 (1978)
57. UNGEMACH, F.R. und HEGNER, D.: *Arch. Toxicol.* **44**, 167-173 (1980)
58. RAAKE, W.: *Untersuchungen über pharmakologische Wirkungen von Purin- und Pyrimidinbasen unter besonderer Berücksichtigung von 4-Methyluracil*. *Habilitationsschrift med. vet. Univ. München* 1982
59. HOPWOOD, L.E., DEWEY, W.C., HEJNY, W.: *Exptl. Cell Res.* **96**, 425-429 (1975)
60. DeLAMIRANDE, G., SIMARD, A.: *Rev. Can. Biol.* **34**, 111-119 (1975)

61. NADAL,C., BOFFA,G.A.: Cell Tissue Kinet. **8**, 297-305 (1975)
62. BUCHER,N.L.R.: The New England J. Med. **277**, 686-696 (1967)
63. WOHLHUETER,R.M., MARZ,R., GRAFF,C.J. und PLAGEMANN,P.G.W.: J. Cell Physiol. **89**, 605-612 (1976)
64. UNGEMACH,F.R. und HEGNER,D.: Mech. Ageing Develop. **14**, 127-135 (1980)
65. CHAPMAN,D.: Quart. Rev. Biophys. **8**, 185-235 (1975)
66. LYKISSAS,E.D., KOUROUNAKIS,P.: Arzneim. Forsch. **30**, 630 (1980)
67. MACHIACO,F., SONNENBICHLER,J.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **358**, 141 (1977)
68. SONNENBICHLER,J., MATTERSBERGER,J., ROSEN,H.: Hoppes-Seylers Z. Physiol. Chem. **357**, 1171 (1976)
69. DÜRR,U.M. und KRAFT,W.: Kompendium der klinischen Laboratoriumsdiagnostik bei Hund, Katze, Pferd. 2./1981. Verlag M. und H. Schaper, Hannover
70. E. und F.W. SCHMIDT: Kleine Enzymfibel, 2./1981 Boehringer Mannheim
71. CARR,J. in: WISSE,E. und KNOOK,D.L. (Ed.): Kupffer Cells and other Liver Sinusoidal Cells. Elsevier, Amsterdam 1977.
72. TENNENT,R.J. und DONALD,K.J.: J. Reticuloend. Soc. **19**, 269-280 (1976)
73. EMEIS,J.J. und WISSE,D.L. in: FURTH,R.: Mononuclear phagocytosis in immunity, infection, and pathology. Blackwell, Oxford 1975.
74. LOEGERING,D.J., KAPLAN,J.E. und SABA,T.M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **152**, 42-46 (1976)
75. ARCHER S.J. und WUST,C.J.: Ann. N.Y. Acad.Sci. **207**, 241-250 (1973)
76. MORE,D.G. und NELSON,D.S.: Experientia **28**, 566-567 (1972)
77. THOMAS,H.C., McSWEEN,R.N.M. und WHITE,R.G.: Lancet **no.7815**, 1288-1290 (1973)
78. BISSEL,D.M., HAMMAKER,L. und SCHMID,R.: J. Cell Biol. **54**, 107-119 (1972)
79. BRADFIELD,J.W.B.: The Lancet **ii**, 883-885, (1974)
80. NABORS,Ch.J., BERLINER,D.L. und DOUGHERTY,T.F.: J. Reticuloend. Soc. **4**, 237-253 (1967)
81. GOVIER,W.C.: J. Pharmacol. Exp. Therap. **150**, 305-308 (1965)
82. WAGLE,S.R., HOFMANN,F. und DECKER,K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **72**, 448-455 (1976)

83. JOYCE,R.A. und CHERVENICK,P.A: J. Clin. Med. **86**, 112-117 (1975)
84. POPPER,H. in: WISSE,E. und KNOOK,D.L., (Ed.): Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Elsevier, Amsterdam, 1977.
85. WIDMANN,J.J. und FAHIMI,H.D.: Am. J. Pathol. **80**, 349 (1975)
86. ROOS,E. und DINGEMANS,K.P. in: WISSE,E. und KNOOK,D.L. (Ed.): Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Elsevier, Amsterdam, 1977.
87. EVANS,R., HIBBS,J.B. und KELLER,R. in: FINK,M.A.(Ed.) The Makrophage in Neoplasia. 1976 Academic Press, New York
88. BENACERREF,B. und SEBESTYEN,M.M.: Fed. Proc. **16**, 860-867 (1957)
89. RIGGI,S.J. und DiLUZIO,N.R.: Am. J. Physiol. **200**, 297-300 (1961)
90. HASSID,W.Z., JOSLYN,M.A. und McCREADY,R.M.: J. Am. Chem. Soc. **63**, 295-298 (1941)
91. DiLUZIO,N.R.: J. Reticuloend. Soc. **4**, 459-475 (1967).
92. DiLUZIO,N.R., WOOLLES,W.R. und MORROW,S.H.: J. Reticuloend. Soc. **1**, 429-441 (1964)
93. GLOVSKY,M.M., DiLUZIO,N.R. und GHEKIERE,L.: J. Reticuloend. Soc. **21**, 54 (1977)
94. BURGALETA,C. und GOLDE,D.W.: Cancer Res. **37**, 1739-1742 (1977)
95. WOOLLES,W.R. und DiLUZIO,N.R.: J. Reticuloend. Soc. **1**, 160-169 (1964)
96. DiLUZIO,N.R. in: WISSE,E. und KNOOK,D.L. (Ed.): Kupffer cells and other sinusoidal cells. Elsevier, Amsterdam 1977
97. WEIDEMANN,M.J., PESKAR,B.A., WROGEMANN,K., RIETSCHEL,E.T., STAUDINGER,H.J. und FISCHER,H.: FEBS-Letters **89**, 136-140 (1978)
98. WROGEMANN,K., WEIDEMANN,M.J., PESKAR,B., STAUDINGER H.J., und FISCHER,H. in: MÜLLER-RICHHOLTZ,W. und MÜLLER-HERMELINK,H.K.(Ed.): Function and structure of the immune system. 1979 Plenum Publishing Corp. New York
99. FISCHER,H., ERNST,M., MALY,F.E., KATO,T., WOKALEK,H., HEBERER,M., MAAS,D., PESKAR,B., RIETSCHEL,E.T. und STAUDINGER,H.J. in: SERIO,M. und PAZZAGLI,M. (Ed.): Luminescence assays in endocrinology and clinical chemistry. 1980 Raven Press, New York

100. PARNHAM, M.J. und BITTNER, C. in: BORS, W., SARAN, M. und TAIT, D. (Ed.): Oxygen radicals in chemistry and biology. 1984 Walter de Gruyter, Berlin
101. BABIOR, B.M.: N. Eng. J. Med. **298**, 659-668 (1978)
102. BADWEY, J.A. und KARNOVSKY, M.L.: Am. Rev. Biochem. **49**, 695-726 (1980)
103. BABIOR, B.M.: N. Engl. J. Med. **298**, 721-726 (1978)
104. WAGNER, H.: in OEHLISCHLÄGER, H. (Hrsg.): Fortschritte in der Arzneimittelforschung. 1984 Wissenschaftl. Verl. Ges. Stuttgart
105. PAUL, J.: Cell and Tissue Culture. 5./1975 Churchill Livingstone, Edinburgh, London.
106. EAGLE, H.: Science **130**, 432 (1959)
107. IVES, D.H., MORSE, P.H. und POTTER, V.R.: J. Biol. Chem. **238**, 1467-1474 (1963)
108. OLSEN, I. und HARRIS, G.: Biochem. J. **146**, 489-496 (1975)
109. BAUR, H., KASPAREK, S. und PFAFF, E.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **356**, 827-838 (1975)
110. MILLER, L.L., BLY, C.G., WATSON, M.L. und BALE, W.F.: J. Exp. Med. **94**, 431-445 (1951)
111. SUGANO, T., SUDA, K., SHIMADA, W. und OSHINO, N.: J. Biochem. **83**, 995-1007 (1978)
112. MANDL, J., McLENNAN, J.D., HOWES, E.L., DeBELLIS, R.H. und SOHLER, A.: J. Clin. invest. **32**, 1323-1329 (1953)
113. INGBRETSEN, J.F. und WAGLE, S.R.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **47**, 403-410 (1972)
114. PACE, D.T. und GARVEY, J.S.: J. Immunol. Meth. **27** 159-173 (1979)
115. FAHIMI, H.D.: J. Cell Biol. **47**, 247 (1970)
116. HIGGINS, G.M. und ANDERSON, R.M.: Arch. Pathol. **12**, 186-202 (1931)
117. MÜHLRADT, P.F.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **330 (Suppl.)**, R 2 (1985)
118. BONTA, I.L., SCHENKELAARS, E.J., ELLIOTT, G.R.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **330 (Suppl.)**, R 3 (1985)
119. CASTIGLI, E., MONTANINI, J., ROBERTI, R., PORCELLATI, G.: Pharmacol. Res. Commun. **9**, 59 (1977)
120. SABA, Th.: Arch. Intern. Med. **126**, 1031-1052 (1970)

121. BAUER,J., DIETER,P., WEBER,W., EYHORN,S., BIRMELIN,M., TRAN-THI,T.-A., HEINRICH,P.C., GEROK,W. and DECKER,K.: Secretion of Polypeptides by Liver Macrophages: Kupffer Cells Synthesize a Factor Inducing Acute Phase Protein Synthesis in Hepatocytes. Third International Kupffer Cell Symposium. Strasbourg 1985. Abstractband
122. BAUER,J., WEBER,W., TRAN-THI,T.-A., NORTHOFF,G.-H., DECKER,K., GEROK,W. and HEINRICH,P.C.: FEBS Lett. **190**, 271-274 (1985)
123. LEE,L., KELLY,R.E., PASTRA-LANDIS,S.C. and EVANS,D.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 6802-6806 (1985)

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1982 bis Oktober 1985 am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Herrn Prof. Dr. D. Hegner, der die Fertigstellung der Arbeit leider nicht mehr erlebte, gilt mein Dank für die Überlassung des Themas und der Arbeitsmöglichkeiten.

Herrn Prof. Dr. H. Wagner danke ich für die Überlassung des Themas, für die Betreuung der Arbeit und besonders für viele hilfreiche Diskussionen des immunologischen Teils der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F. R. Ungemach sei mein Dank und meine Anerkennung für die intensive Zusammenarbeit, die vielen Gespräche und Anregungen, die sich besonders während des biochemischen Teils der Arbeit ergaben, ausgesprochen. Herzlich danken möchte ich für die stets gewährte Betreuung und hilfreichen Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. G. Hartmann danke ich für wertvolle Hinweise und Diskussionsbeiträge während der Abfassung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Mayr und Herrn Dr. Brunner danke ich für die Isolierung des Paramunitätsinducers sowie für die geduldig gewährte Bereitschaft zu fruchtbaren Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. W. Kraft danke ich für die Möglichkeit, das klinische Labor nutzen zu dürfen.

Frau Dr. K. Jurcic sei gedankt für die freundliche Unterstützung, die ich bei den Biolumineszenzmessungen erfahren durfte sowie für die wertvollen Diskussionsbeiträge.

Allen Angehörigen des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie sei für die freundliche Aufnahme und für die stets bereitwillig gewährte Hilfe gedankt.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die durch Vereinigung elterlicher Liebe und Strenge mir das alles ermöglicht haben.

Danken möchte ich zum Schluß meiner Frau Monika für ihr Verständnis und ihre ständige Hilfsbereitschaft, die dadurch sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

LEBENS LAUF

Christian Peter A l t s c h u h
geboren am 13.10.1955 in Kraiburg am Inn
seit Oktober 1984 verheiratet mit der Apotheke-
rin Monika Margareta Berger, 1 Kind

Eltern: Christian Altschuh, Studiendirektor
Annemarie Altschuh, geb. Sturm, Oberlehrerin

Schulbildung: 1962 - 1966 Volksschule Wasserburg
1966 - 1975 Luitpold-Gymnasium Wasserburg
Abitur im Juni 1975

Wehrdienst: 1975 - 1977 in Landsberg und Bad Reichenhall

Studium: vom WS 1977/78 bis zum WS 1980/82 Studium der
Pharmazie an der Ludwig-Maximilian-Universität
zu München; 2. Abschnitt der Pharmazeutischen
Prüfung im April 1981.

Praktikum: Pharmaziepraktikum von Mai 1981 bis Dezember
1981 in der Apotheke am Waldheimplatz in München
und von Januar 1982 bis Mai 1982 am Institut für
Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Approbation: 8. Juli 1982

Wissenschaft-
liche Tätig-
keit: vom 1. Januar 82 bis 31. Oktober 1984 Wissen-
schaftlicher Angestellter im Rahmen von For-
schungsaufträgen der Fraunhofer-Gesellschaft.
Seit 1. November 1984 Wissenschaftlicher Ange-
stellter im Rahmen eines Projektes über die
Doping-Analytik im Trabrennsport. Veröffentli-
chungen auf dem Gesamtkongreß der Pharmazeuti-
schen Wissenschaften in München, dem Falk-Sympo-
sium in Basel, den Pharmakologisch-Toxikologi-
schen Seminaren in München und dem Joint Meeting
of the Belgian, Dutch and German Pharmacological
and Toxicological Societies in Aachen. Weitere
Vorträge auf der Frühjahrstagung der Deutschen
Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie
in Mainz sowie am 2. Symposium international sur
l'Analyse des medicaments in Brüssel.

